

---

**Kinetische und präparative Studien mit neuen  
Sialinsäuresynthasen aus *Neisseria meningitidis* und  
*Campylobacter jejuni***



TECHNISCHE  
UNIVERSITÄT  
DARMSTADT

Vom Fachbereich Chemie der Technischen Universität Darmstadt  
zur Erlangung des Grades eines

Doktor-Ingenieurs (Dr.-Ing.)

genehmigte

**Dissertation**

vorgelegt von

**Dipl.-Ing. Mark Schnellbächer**

aus Lindenfels


Referent:	Prof.-Dr. W.-D. Fessner
Korreferent:	Prof.-Dr. H. Kolmar
Tag der Einreichung:	08. September 2016
Tag der mündlichen Prüfung:	31. Oktober 2016

Darmstadt 2017

**D17**

---





---

Die experimentellen Arbeiten für die vorliegende Dissertation wurden unter der Leitung von Herrn Prof.-Dr. Wolf-Dieter Fessner am Clemens-Schöpf-Institut für Organische Chemie und Biochemie an der Technischen Universität Darmstadt im Zeitraum von August 2008 bis Juli 2014 durchgeführt.

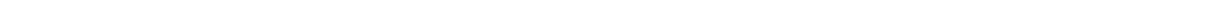
---







***Meiner Familie und meinen Freunden...***





---

## Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater, **Herrn Prof.-Dr. Wolf-Dieter Fessner**, für die interessante Themenstellung und die gute Betreuung meiner Arbeit in den letzten Jahren. Die regen Diskussionen und seine fördernde Art haben mich stets motiviert.

Ein großer Dank geht an alle meine ehemaligen Arbeitskreiskollegen: Dr.-Ing. Ning He, Dr. Titu Devamani, Dipl.-Ing. Dirk Heyl, Dr. rer. nat. Deniz Güçlü; Dipl.-Chem. Thomas Scheidt, Dipl.-Biochem. Sebastian Junker, Dr. Dong Yi, Dr. Madhura Rale, Dipl.-Ing. Eva Heilig, Dipl.-Biochem. Steffen Kühl, Bettina Harnischfeger, Hans-Michael Orfgen, und Serbet Pinar-Safi für die schöne gemeinsame Zeit, die vielen lehrreichen Diskussionen, die nie endende Hilfe bei allen Problemen und das stets offene Ohr.

Ein weiterer Dank geht an Frau Prof.-Dr. Castiglione für die Bereitstellung der *N*-Acetylglucosamin-2-epimerase und die interessante Kommunikation zum Thema.

Meinem langjährigen Laborkollegen Michael Kickstein danke ich ebenfalls von Herzen für die tollen gemeinsamen Jahre im Labor und für seine immer tatkräftige Unterstützung und Hilfe bei der Herstellung aller Enzyme. Das hat mir die Arbeit um einiges erleichtert, ohne deine Hilfe wäre es nichts geworden, danke MICHAEL.

Außerdem möchte ich mich noch bei all jenen bedanken, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Ich bedanke mich bei Herrn PD Dr. Reinhard Meusinger, Herrn Karl-Otto Runzheimer und Frau Karin Jungk aus unserer NMR-Abteilung, sowie bei Frau Christiane Rudolph und Frau Gül Sahinalp aus der MS-Abteilung.

Mein allergrößter Dank gilt meinem Vater Roland, meiner Stiefmutter Ursula, meinem Bruder Lutz, seiner Lebensgefährtin Stephanie und meinen Freunden für die vielen aufbauenden Worte und die nicht endende Unterstützung während der Promotion und der gesamten Studienzeit.

---



---

# Inhaltsverzeichnis

---

<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>i</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>v</b>
<b>Verzeichnis der Schemata</b>	<b>x</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>xiii</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>xv</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Vorkommen und Eigenschaften von Sialinsäuren in der Natur	1
1.2 Metabolismus der Sialinsäuren	6
1.2.1 N-Acetylneuraminsäure-Metabolismus in Säugern	6
1.2.2 Sialinsäuremetabolismus in pathogenen Organismen	7
1.3 Die PEP-abhängige Synthese aus <i>Neisseria meningitidis</i>	11
1.4 Die PEP-abhängigen Synthesen aus <i>Campylobacter jejuni</i>	22
<b>2 Zielsetzung</b>	<b>25</b>
<b>3 Ergebnisse</b>	<b>27</b>
3.1 Präparative Synthesen	27
3.1.1 Synthese von N-modifizierten Aminosuktern	27
3.1.2 Synthese von Phosphoenolpyruvat (PEP)	39
3.1.3 Chemische Synthese des Acridon-verknüpften Lactosylakzeptors (23)	40
3.2 Enzymatische Synthese von Sialinsäuren und Derivaten	47
3.2.1 Enzymatische Synthesen mit den PEP-abhängigen Sialinsäuresynthesen aus <i>Campylobacter jejuni</i>	48
3.2.1.1 Präparative Synthesen mit den Sialinsäuresynthesen $\text{PseS}_{Cje}$ und dem NeuB2-Protein	48
3.2.1.2 Präparative Synthesen mit den N-Acetylneuraminsäuresynthesen $\text{NeuS}_{Nme}$ und $\text{NeuS}_{Cje}$	60

<b>3.3</b>	<b>Aktivierung und Transfer von Sialinsäurederivaten</b>	<b>66</b>
<b>3.4</b>	<b>Kinetische Studien mit den PEP-abhängigen Sialinsäuresynthasen</b>	<b>72</b>
3.4.1	Bekannte Methoden für die kinetische Untersuchungen von Sialinsäuresynthasen	72
3.4.2	Entwicklung eines gekoppelten, kontinuierlichen Assays	76
3.4.3	Bestimmung der kinetischen Konstanten für NeuS <sub>Nme</sub> und NeuS <sub>Cje</sub> für deren natürliche Substrate PEP und ManNAc	83
3.4.4	Bestimmung der kinetischen Konstanten <i>N</i> -acetylierter Mannosaminderivate	89
3.4.5	Kontinuierlicher gekoppelter Enzym-Assay mit AGE <sub>Ava</sub> und den <i>N</i> -Acetylneuraminsäuresynthasen NeuS <sub>Nme</sub> und NeuS <sub>Cje</sub>	96
3.4.6	Bestimmung der kinetischen Konstanten <i>N</i> -acylierter Glucosaminderivate mit den beiden Synthasen NeuS <sub>Nme</sub> und NeuS <sub>Cje</sub>	101
3.4.7	Bestimmung der kinetischen Konstanten <i>N</i> -acylierter Galactosaminderivate mit den beiden Synthasen NeuS <sub>Nme</sub> und NeuS <sub>Cje</sub>	108
3.4.8	Bestimmung der kinetischen Konstanten von weiteren ausgewählten Zuckern mit den beiden <i>N</i> -Acetylneuraminsäuresynthasen NeuS <sub>Nme</sub> und NeuS <sub>Cje</sub>	114
3.4.9	Kinetische Untersuchung der Pseudaminsäuresynthase aus <i>Campylobacter jejuni</i> (PseS <sub>Cje</sub> )	127
3.4.10	Interpretation der kinetischen Ergebnisse anhand der Proteinstrukturen	134
<b>4</b>	<b>Zusammenfassung und Ausblick</b>	<b>166</b>
<b>4.1</b>	<b>Chemische Synthese der Enzymsubstrate</b>	<b>166</b>
<b>4.2</b>	<b>Etablierung eines kontinuierlichen High-Throughput-Assays für die kinetische Charakterisierung der Synthasen</b>	<b>168</b>
4.2.1	Kinetische Studien mit den Synthasen NeuS <sub>Nme</sub> und NeuS <sub>Cje</sub>	169
4.2.2	Kinetische Studien mit der Pseudaminsäuresynthase PseS <sub>Cje</sub>	170
4.2.3	Vergleich der Strukturen der NeuS <sub>Nme</sub> , NeuS <sub>Cje</sub> , PseS <sub>Cje</sub> und des NeuB2-Proteins mit anderen PEP-abhängigen Synthasen	171
<b>5</b>	<b>Experimenteller Teil</b>	<b>173</b>
<b>5.1</b>	<b>Allgemeine Bemerkungen</b>	<b>173</b>
<b>5.2</b>	<b>Allgemeine Herstellung der verwendeten Enzyme</b>	<b>178</b>

---

5.2.1	Fermentation	178
5.2.2	Zellaufschluss	179
5.2.3	Aufreinigung der Enzyme	179
<b>5.3</b>	<b>Synthese</b>	<b>181</b>
5.3.1	Allgemeine Arbeitsvorschriften	181
5.3.2	Präparative Synthesen	186
<b>6</b>	<b>Anhang</b>	<b>226</b>
<b>6.1</b>	<b>Gensequenzen und Plasmidkarten</b>	<b>226</b>
6.1.1	<i>N</i> -Acetylneuraminsäuresynthase aus <i>Neisseria meningitidis</i> (NeuS <sub>Nme</sub> )	226
6.1.2	<i>N</i> -Acetylneuraminsäuresynthase aus <i>Campylobacter jejuni</i> (NeuS <sub>Cje</sub> )	228
6.1.3	NeuB2-Protein aus <i>Campylobacter jejuni</i> (NeuB2 <sub>Cje</sub> )	229
6.1.4	Pseudaminsäuresynthase aus <i>Campylobacter jejuni</i> (PseS <sub>Cje</sub> )	230
<b>6.2</b>	<b>Literatur</b>	<b>231</b>





# Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1.1:</b>	Übersicht über die wichtigsten in Wirbeltieren und Mikroorganismen vorkommenden Sialinsäuren.....	2
<b>Abbildung 1.2:</b>	Bekannte strukturelle Modifikationen der Neuraminsäure (Neu). <sup>[1,14]</sup> .....	3
<b>Abbildung 1.3:</b>	Beispiele von bekannten Derivaten <b>[a]</b> der Pseudaminsäure und <b>[b]</b> der Legionnamsäure. <sup>[16]</sup> .....	3
<b>Abbildung 1.4:</b>	Struktur des humanen Gangliosides GM1 mit $\alpha$ -2,3-verknüpften <i>N</i> -Acetylneuraminsäure (Neu5Ac). Basis des Gangliosides ist eine Sphingolipideinheit (Ceramid), an diese schließt sich eine Oligosaccharidkette an, bestehend aus unterschiedlichen Zuckern. Neben Glucose und Galactose findet sich auch <i>N</i> -Acetylgalactosamin in der Kette. Neben einem terminalen Galactoserest besitzt das Gangliosid zusätzlich eine terminale <i>N</i> -Acetylneuraminsäure.....	4
<b>Abbildung 1.5:</b>	Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von <i>Neisseria meningitidis</i> Serogroup B. <sup>[53]</sup> .....	11
<b>Abbildung 1.6:</b>	Für kristallographische Studien mit der NeuS <sub>Nme</sub> eingesetzte Substrate <b>[a]</b> das natürliche Substrat ManNAc <b>[b]</b> <i>N</i> -Acetylmannosaminol <sup>[30]</sup> <b>[c]</b> Inhibitor (X=OPO <sub>3</sub> <sup>-</sup> , Y=H bzw. X=H, Y=OPO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ). <sup>[55]</sup> .....	12
<b>Abbildung 1.7:</b>	Kristallstruktur der <i>N</i> -Acetylneuraminsäuresynthase NeuS <sub>Nme</sub> (PDB-Code 1XUZ). <b>[a]</b> als Homodimer und <b>[b]</b> als Monomer mit den Substraten in der <i>active-site</i> . <sup>[56]</sup> Die Substrate rManNAc und PEP sind in grün und das zweiwertige Mangan in violett dargestellt. ....	13
<b>Abbildung 1.8:</b>	An der katalytischen Reaktion in der <i>active-site</i> von NeuS <sub>Nme</sub> beteiligte Aminosäurereste, sowie die für die katalytische Aktivität essentielle Aminosäure Arg 314 aus der AFP-III-ähnlichen Domäne der gegenüberliegenden Untereinheit des Homodimers NeuS <sub>Nme</sub> . ....	15
<b>Abbildung 1.9:</b>	Kristallstruktur von KDO8PS aus <i>Neisseria meningitidis</i> Serogroup B (PDB-Code 2QKF) als Homotetramer und als monomere Untereinheit. ....	18
<b>Abbildung 1.10:</b>	Kristallstruktur von DAH7PS aus <i>Neisseria meningitidis</i> Serogroup B (PDB-Code 1RZM) als Homotetramer und als monomere Untereinheit. ....	20
<b>Abbildung 1.11:</b>	Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von <i>Campylobacter jejuni</i> . <sup>[72]</sup> Das Flagellum ist in braun dargestellt. ....	22
<b>Abbildung 1.12:</b>	Struktur des GM1-artigen Lipooligosaccharides (LOS) aus <i>Campylobacter jejuni</i> . Das Epitop des LOS, mit der identischen Struktur des Gangliosids GM1, ist rot, der Linker und der Anker zwischen Epitop und Zelloberfläche sind blau umrandet.....	23
<b>Abbildung 3.1:</b>	Struktur des aus einem Äquivalent Propiolsäure <b>60</b> und zwei Äquivalenten HOBT <b>63</b> entstehenden Intermediats <b>67</b> .....	37
<b>Abbildung 3.2:</b>	Beispiele für häufig verwendete Fluoreszenzchromophore sind Derivate von Fluorescein (FITC) <b>76</b> , Rhodamin (Lissamin <sup>TM</sup> ) <b>77</b> , Cumarin <b>78</b> und Acridon <b>79</b> .....	41
<b>Abbildung 3.3:</b>	Struktur des verwendeten Acridon-gelabelten Lactosylakzeptors <b>23</b> . <sup>[46]</sup> .....	42
<b>Abbildung 3.4:</b>	<b>[a]</b> Original <sup>1</sup> H-NMR-Spektrum (D <sub>2</sub> O, 500 MHz, 300 K) von 5- <i>epi</i> -Neu5Ac <b>24</b> mit einem unbekannten Nebenprodukt als Hauptprodukt. Das erwartete Produkt <b>24</b> ist nur in Spuren vorhanden. <b>[b]</b> Dasselbe Spektrum gespreizt im Bereich 3,5-4,3 ppm, hier finden sich die zum Produkt <b>24</b> gehörenden Signale. ....	55
<b>Abbildung 3.5:</b>	In Frage kommende Strukturen für das bei den präparativen Synthesen unerwünschte entstandene Hauptprodukt. ....	56
<b>Abbildung 3.6:</b>	Struktur des als Alanopin <b>56</b> identifizierten Nebenproduktes in den präparativen Synthesen mit der Pseudaminsäuresynthase PseS <sub>Cje</sub> . ....	57

<b>Abbildung 3.7:</b>	2D-NMR-spektroskopische Strukturaufklärung für <b>31</b> . Die wichtigsten Signale zur Strukturaufklärung sind hervorgehoben. * Im COSY für <b>31</b> sind bei 13-25 alle Signale zu finden mit Ausnahme der fünf quartären Kohlenstoffe im Acridon. ....	71
<b>Abbildung 3.8:</b>	Eichgerade von NADH bei unterschiedlichen Konzentrationen zwischen 0,00-0,20 mM aufgenommen bei $\lambda = 340$ nm. Bei höheren NADH-Konzentration verlässt man schnell den linearen Bereich und kommt in die Sättigung. ....	79
<b>Abbildung 3.9:</b>	Verlauf der Messkurven bei der photometrischen Verfolgung der Reaktion über die Absorptionsabnahme von NADH bei $\lambda = 340$ nm. ....	85
<b>Abbildung 3.10:</b>	Beispiel für eine typische, aus den Rohdaten (Abb. 3.9) resultierende Sättigungskurve für PEP <b>1</b> vermessen mit der <i>N</i> -Acetylneuraminsäuresynthase NeuS <sub>Cje</sub> . ....	86
<b>Abbildung 3.11:</b>	Aus den Rohdaten resultierende Sättigungskurve für das zweite natürliche Substrat ManNAc <b>2</b> vermessen mit der <i>N</i> -Acetylneuraminsäuresynthase NeuS <sub>Nme</sub> . ....	87
<b>Abbildung 3.12:</b>	Für die kinetischen Untersuchungen als Substrate getesteten <i>N</i> -acylierten Mannosaminderivate <b>3-9</b> . ....	89
<b>Abbildung 3.13:</b>	$K_M$ -Werte der beiden Synthesen NeuS <sub>Nme</sub> und NeuS <sub>Cje</sub> gegenüber den <i>N</i> -modifizierten Mannosaminderivaten <b>3</b> bis <b>9</b> . Substrat <b>9</b> wurde nur mit NeuS <sub>Nme</sub> vermessen. ....	91
<b>Abbildung 3.14:</b>	Vergleich der molekularen Aktivität ( $k_{cat}$ -Wert) der beiden <i>N</i> -Acetylneuraminsäuresynthasen NeuS <sub>Nme</sub> und NeuS <sub>Cje</sub> mit den jeweiligen <i>N</i> -acylierten Mannosaminderivaten <b>3-9</b> . Substrat <b>9</b> wurde nur mit NeuS <sub>Nme</sub> vermessen. ....	92
<b>Abbildung 3.15:</b>	Vergleich der katalytischen Effizienz ( $k_{cat}/K_M$ ) der beiden <i>N</i> -Acetylneuraminsäuresynthasen NeuS <sub>Nme</sub> und NeuS <sub>Cje</sub> gegenüber den jeweiligen <i>N</i> -modifizierten Mannosaminderivaten <b>3-9</b> . Für den besseren Vergleich ist die Darstellung hier logarithmisch gewählt. Substrat <b>9</b> wurde nur mit der NeuS <sub>Nme</sub> vermessen. ....	93
<b>Abbildung 3.16:</b>	<b>[a]</b> Verlauf der Messkurven bei steigender <i>N</i> -Acetylglucosaminkonzentration. Die Absorption nimmt entsprechend schneller ab. <b>[b]</b> Aus den Rohdaten von <b>[a]</b> mittels eines Fites an eine Michaelis-Menten-Kinetik ermittelte Sättigungskurve zur Bestimmung des $K_M$ -Wertes von <i>N</i> -Acetylglucosamin <b>10</b> . ....	97
<b>Abbildung 3.17:</b>	Untersuchung des Assays zur Lokalisierung der Ursache für die unerwartete NADH-Abnahme in Abwesenheit der <i>N</i> -Acetylglucosamin-2-Epimerase AGE <sub>Ava</sub> . Anstelle von Neu5Ac <b>87</b> und in Abwesenheit von Pyruvat wurden hier die Glucosaminderivate <b>10-15</b> für die Messungen eingesetzt. Als Positivkontrolle für die Messungen diente <i>N</i> -Acetylneuraminsäure <b>87</b> . ....	99
<b>Abbildung 3.18:</b>	Untersuchung des kompletten Recycling-Assays. Es wurden zwei unterschiedliche Messreihen durchgeführt, eine in Anwesenheit von Phosphoenolpyruvat <b>1</b> und den jeweiligen Glucosaminderivaten bei 20 mM und die andere in Abwesenheit von Phosphoenolpyruvat <b>1</b> . Die Positivkontrolle wurde mit <i>N</i> -Acetylmannosamin <b>2</b> als Substrat gemessen. ....	100
<b>Abbildung 3.19:</b>	Für die kinetischen Untersuchungen von NeuS <sub>Nme</sub> und NeuS <sub>Cje</sub> als Substrate getesteten <i>N</i> -acylierten Glucosaminderivate <b>10-15</b> . ....	101
<b>Abbildung 3.20:</b>	$K_M$ -Werte der beiden Synthesen NeuS <sub>Nme</sub> und NeuS <sub>Cje</sub> gegenüber den <i>N</i> -modifizierten Glucosaminderivaten <b>10</b> bis <b>15</b> . ....	103
<b>Abbildung 3.21:</b>	Vergleich der molekularen Aktivität ( $k_{cat}$ -Wert) der beiden <i>N</i> -Acetylneuraminsäuresynthasen NeuS <sub>Nme</sub> und NeuS <sub>Cje</sub> mit den jeweiligen <i>N</i> -acylierten Glucosaminderivaten <b>10-15</b> . ....	104
<b>Abbildung 3.22:</b>	Vergleich der katalytischen Effizienz ( $k_{cat}/K_M$ ) der beiden <i>N</i> -Acetylneuraminsäuresynthasen NeuS <sub>Nme</sub> und NeuS <sub>Cje</sub> gegenüber den	

	jeweiligen <i>N</i> -modifizierten Glucosaminderivaten <b>10-15</b> . Für den besseren Vergleich ist die Darstellung hier logarithmisch gewählt.....	105
<b>Abbildung 3.23:</b>	<i>N</i> -acylierte Galactosaminderivate <b>18-22</b> als potentielle Substrate für die kinetischen Untersuchungen von NeuS <sub>Nme</sub> und NeuS <sub>Cje</sub> .....	108
<b>Abbildung 3.24:</b>	$K_M$ -Werte der beiden Synthesen NeuS <sub>Nme</sub> und NeuS <sub>Cje</sub> gegenüber den <i>N</i> -modifizierten Galactosaminderivaten <b>18 bis 22</b> . * Für Substrat <b>21</b> konnten trotz mehrerer Versuche keine auswertbaren Kurven gemessen werden. ....	109
<b>Abbildung 3.25:</b>	Vergleich der molekularen Aktivität ( $k_{cat}$ -Wert) der beiden <i>N</i> -Acetylneuraminsäuresynthasen NeuS <sub>Nme</sub> und NeuS <sub>Cje</sub> mit den jeweiligen <i>N</i> -acylierten Galactosaminderivaten <b>18-22</b> . Für den besseren Vergleich ist die Darstellung hier logarithmisch gewählt. ....	110
<b>Abbildung 3.26:</b>	Katalytischen Effizienz ( $k_{cat}/K_M$ ) der beiden <i>N</i> -Acetylneuraminsäuresynthasen NeuS <sub>Nme</sub> und NeuS <sub>Cje</sub> gegenüber den <i>N</i> -modifizierten Galactosaminderivaten <b>18-22</b> . Für den besseren Vergleich ist die Darstellung hier logarithmisch gewählt. ....	111
<b>Abbildung 3.27:</b>	Für kinetische Untersuchungen von NeuS <sub>Nme</sub> und NeuS <sub>Cje</sub> als Substrate eingesetzten freien Aminosucker <b>33-35</b> .....	114
<b>Abbildung 3.28:</b>	$K_M$ -Werte der beiden <i>N</i> -Acetylneuraminsäuresynthasen NeuS <sub>Nme</sub> und NeuS <sub>Cje</sub> gegenüber den Aminosuckern Mannosamin <b>33</b> , Glucosamin <b>34</b> und Galactosamin <b>35</b> . Die Aminosucker wurden in Form ihrer neutralen Hydrochloride eingesetzt.....	116
<b>Abbildung 3.29:</b>	Vergleich der molekularen Aktivität ( $k_{cat}$ -Wert) der beiden <i>N</i> -Acetylneuraminsäuresynthasen NeuS <sub>Nme</sub> und NeuS <sub>Cje</sub> untereinander zu den Aminosuckern Mannosamin <b>33</b> , Glucosamin <b>34</b> und Galactosamin <b>35</b> . Für den besseren Vergleich ist die Darstellung hier logarithmisch gewählt. ....	117
<b>Abbildung 3.30:</b>	Katalytischen Effizienz ( $k_{cat}/K_M$ ) der beiden <i>N</i> -Acetylneuraminsäuresynthasen NeuS <sub>Nme</sub> und NeuS <sub>Cje</sub> gegenüber den Aminosuckern Mannosamin <b>33</b> , Glucosamin <b>34</b> und Galactosamin <b>35</b> . Für den besseren Vergleich ist die Darstellung hier logarithmisch gewählt. ....	118
<b>Abbildung 3.31:</b>	Weitere für die kinetischen Untersuchungen von NeuS <sub>Nme</sub> und NeuS <sub>Cje</sub> als potentielle Substrate getesteten Zucker <b>36-44</b> .....	120
<b>Abbildung 3.32:</b>	$K_M$ -Werte der beiden <i>N</i> -Acetylneuraminsäuresynthasen NeuS <sub>Nme</sub> und NeuS <sub>Cje</sub> gegenüber den unterschiedlichen Zuckern <b>36 bis 44</b> . * Für Substrat <b>44</b> konnten trotz mehrerer Versuche keine auswertbaren Kurven gemessen werden. ....	121
<b>Abbildung 3.33:</b>	Vergleich der molekularen Aktivität ( $k_{cat}$ -Wert) der beiden <i>N</i> -Acetylneuraminsäuresynthasen NeuS <sub>Nme</sub> und NeuS <sub>Cje</sub> mit den Zuckern <b>36-43</b> . Für den besseren Vergleich ist die Darstellung hier logarithmisch gewählt. ....	122
<b>Abbildung 3.34:</b>	Vergleich der katalytischen Effizienz ( $k_{cat}/K_M$ ) der beiden <i>N</i> -Acetylneuraminsäuresynthasen NeuS <sub>Nme</sub> und NeuS <sub>Cje</sub> gegenüber den jeweiligen Zuckern <b>36-43</b> . Für den besseren Vergleich ist die Darstellung logarithmisch gewählt.....	124
<b>Abbildung 3.35:</b>	Im kontinuierlich gekoppelten Assay mit der Pseudaminsäuresynthase PseS <sub>Cje</sub> getesteten Substrate. Neben <i>N</i> -Acetylglucosamin <b>10</b> waren dies die <i>N</i> -acylierten Glucosaminderivate <b>11-15</b> und die entsprechenden Galactosaminderivate <b>18-22</b> . ....	128
<b>Abbildung 3.36:</b>	$K_M$ -Werte der Pseudaminsäuresynthase PseS <sub>Cje</sub> gegenüber dem natürlichen Substrat PEP <b>1</b> und den <i>N</i> -modifizierten Aminosuckeranaloga <b>10</b> und <b>18-22</b> . Zum besseren Vergleich ist die Auftragung logarithmisch.....	129
<b>Abbildung 3.37:</b>	Molekulare Aktivität ( $k_{cat}$ -Wert) der Pseudaminsäuresynthase PseS <sub>Cje</sub> gegenüber dem natürlichen Substrat PEP <b>1</b> und den <i>N</i> -acylierten Aminosuckerderivaten <b>10</b> und <b>18-22</b> . Zum besseren Vergleich ist die Auftragung logarithmisch.....	131
<b>Abbildung 3.38:</b>	Katalytischen Effizienz ( $k_{cat}/K_M$ ) der Pseudaminsäuresynthase PseS <sub>Cje</sub> gegenüber dem natürlichen Substrat PEP <b>1</b> und den <i>N</i> -modifizierten Aminosuckerderivaten <b>10</b> und <b>18-22</b> . Zum besseren Vergleich ist die Auftragung logarithmisch. ....	132

<b>Abbildung 3.39:</b>	Struktur und tertiäres Faltungsmuster der PEP-abhängigen Synthasen <b>[a]</b> KDO8PS (PDB-Code 2A2I) <sup>[136]</sup> und DAH7PS (PDB-Code 1RZM) <sup>[65]</sup> , <b>[b]</b> NeuS <sub>Nme</sub> (PDB-Code 1XUZ) <sup>[30]</sup> im Vergleich.....	139
<b>Abbildung 3.40:</b>	Vergleich der <i>active-sites</i> der PEP-abhängigen Synthasen <b>[a]</b> KDO8PS und DAH7PS überlagert, <b>[b]</b> NeuS <sub>Nme</sub> mit KDO8PS und <b>[c]</b> NeuS <sub>Nme</sub> mit DAH7PS. Für einen besseren Vergleich der jeweiligen <i>active-sites</i> wurde versucht die jeweiligen Substrate übereinander zu legen. Aufgrund der Farbcodierung der einzelnen Enzyme sind die Kohlenstoffketten der Substrate in <b>[a]</b> und <b>[c]</b> hellgrau und in <b>[b]</b> grün dargestellt.....	141
<b>Abbildung 3.41:</b>	Simulierte 3D-Struktur von <b>[a]</b> NeuB2-Protein im Vergleich zu <b>[b]</b> der experimentellen Struktur von NeuS <sub>Nme</sub> (PDB-Code 1XUZ ). .....	143
<b>Abbildung 3.42:</b>	Vergleich der tertiären Faltungsmotive der simulierten Struktur von NeuB2 mit <b>[a]</b> der KDO8PS (PDB-Code 2A2I) und <b>[b]</b> der DAH7PS (PDB-Code 1RZM). .....	144
<b>Abbildung 3.43:</b>	Phylogenetischer Stammbaum der PEP-abhängigen Synthasen, erstellt auf Basis einer vergleichenden Primärsequenzanalyse der Synthasen. Der Stammbaum wurde mit dem Programm BioEdit <sup>[145]</sup> unter Verwendung der neighbour-joining-Methode erstellt.....	146
<b>Abbildung 3.44:</b>	Detaillierte Ansicht der <i>active-site</i> von NeuS <sub>Nme</sub> <b>[a]</b> Blick durch den Eingang der Tasche in die <i>active-site</i> und <b>[b]</b> Darstellung aller an der katalytischen Reaktion durch polare Wechselwirkungen beteiligten Aminosäuren. Die beiden Substrate rManNAc, PEP sowie das Arg314 sind in grün und das zweiwertige Mangan in violet dargestellt. ....	147
<b>Abbildung 3.45:</b>	Detaillierter Vergleich der <i>active-sites</i> von NeuS <sub>Nme</sub> und NeuS <sub>Cje</sub> , <b>[a]</b> Blick durch den Eingang der Tasche in die <i>active-site</i> von NeuS <sub>Cje</sub> (simuliertes Modell) und <b>[b]</b> vergleichende Darstellung aller durch polare Wechselwirkungen an der Reaktion beteiligten Aminosäuren. Die beiden Substrate rManNAc, PEP sowie das Arg314 sind in grün und das zweiwertige Mangan in violet dargestellt.....	151
<b>Abbildung 3.46:</b>	Darstellung aller in der <i>active-site</i> von NeuS <sub>Cje</sub> durch polare Wechselwirkungen an der Reaktion beteiligten Aminosäuren, sowie aller Aminosäuren welche die korrekte Lage und Ausrichtung des Arg314 gewährleisten. Die beiden Substrate rManNAc, PEP sowie das Arg314 sind in grün und das zweiwertige Mangan in violet dargestellt. ....	152
<b>Abbildung 3.47:</b>	Untersuchung der Peripherie beider <i>N</i> -Acetylneuraminsäuresynthasen NeuS <sub>Nme</sub> (PDB-Code 1XUZ) und NeuS <sub>Cje</sub> (simuliertes Modell) zur Klärung des Unterschiedes der schlechteren Affinitäten und Aktivitäten von NeuS <sub>Cje</sub> gegenüber den jeweiligen Substraten. <b>[a]</b> Lage der active site in der <i>N</i> -terminalen Domäne (beteiligte Aminosäuren als Sticks dargestellt) und <b>[b]</b> Vergleich aller Aminosäuren in der Domäne (identische AS als Linien, unterschiedliche AS als Sticks dargestellt) .....	153
<b>Abbildung 3.48:</b>	Vergleich der Taschen mit den active sites der beiden PEP-abhängigen Synthasen NeuS <sub>Cje</sub> und PseS <sub>Cje</sub> . Beide Modelle sind simuliert, da die simulierte Struktur von NeuS <sub>Cje</sub> in der <i>active-site</i> identisch mit der bestätigten Struktur von NeuS <sub>Nme</sub> ist, wurde diese zum Vergleich verwendet. Die beiden Substrate rManNAc und PEP sind in grün und das zweiwertige Mangan in violet dargestellt. ....	159
<b>Abbildung 3.49</b>	Für den Vergleich der <i>active-site</i> und den an der Reaktion durch polare Wechselwirkungen beteiligten Aminosäuren wurde wieder die experimentelle Struktur von NeuS <sub>Nme</sub> (PDB-Code 1XUZ) verwendet und mit dem simulierten Modell der PseS <sub>Cje</sub> überlagert. Die beiden Substrate rManNAc und PEP sind in grün und das zweiwertige Mangan in violet dargestellt.....	160
<b>Abbildung 3.50:</b>	Überblick über alle durch polare Wechselwirkungen an der katalysierten Reaktion beteiligten Aminosäuren inklusive dem Arg309 aus der AFP-III-ähnlichen Domäne der zweiten Untereinheit. Die beiden Substrate rManNAc, PEP sowie das Arg309 sind in grün und das zweiwertige Mangan in violet dargestellt. ....	161

---

<b>Abbildung 4.1:</b>	Überlagerte Darstellung der an der katalytischen Reaktion von NeuS <sub>Nme</sub> und NeuS <sub>Cje</sub> durch polare Wechselwirkungen beteiligten Aminosäurereste.....	170
-----------------------	--	-----

## Verzeichnis der Schemata

<b>Schema 1.1:</b>	Biosyntheseweg der <i>N</i> -Acetylneuraminsäure <b>Neu5Ac</b> in Säugetieren. ....	7
<b>Schema 1.2:</b>	Biosyntheseweg zu <i>N</i> -Acetylneuraminsäure <b>Neu5Ac</b> in pathogenen Mikroorganismen. ....	8
<b>Schema 1.3:</b>	Biosyntheseweg der Pseudaminsäure (Pse) in <i>Campylobacter jejuni</i> ausgehend von UDP- <i>N</i> -Acetylglucosamin. <sup>[16, 37]</sup> .....	8
<b>Schema 1.4:</b>	Legionaminsäurebiosynthese in <i>Campylobacter jejuni</i> . <sup>[16]</sup> .....	9
<b>Schema 1.5:</b>	Beispiel für die Übertragung einer Sialinsäure <b>[a]</b> Aktivierung von Neu5Ac mittels CSS <sub>Nme</sub> <b>[b]</b> Sialyltransfer von CMP-Neu5Ac auf ein Akzeptormolekül GalNAc. ....	10
<b>Schema 1.6:</b>	Mechanistische Details der von NeuS <sub>Nme</sub> katalysierten Reaktion. <sup>[30]</sup> .....	17
<b>Schema 1.7:</b>	Von der KDO8PS <sub>Nme</sub> katalysierte Kondensationsreaktion zwischen Arabinose-5-phosphat (A5P) und PEP zu 2-Keto-3-deoxy-D-manno-octosonsäure-8-phosphat (KDO8P) dem Auftaktschritt im Biosyntheseweg zu 2-Keto-3-deoxy-D-manno-octosonsäure (KDO). ....	19
<b>Schema 1.8:</b>	DAH7PS <sub>Nme</sub> -katalysierter Auftaktschritt im Shikimat-Biosyntheseweg, die Kondensationsreaktion zwischen Phosphoenolpyruvat ( <b>PEP</b> ) und Erythrose-4-phosphat ( <b>E4P</b> ) zu 3-Deoxy-heptulosonsäure-7-phosphat ( <b>DAH7P</b> ). ....	21
<b>Schema 1.9:</b>	Reversible Adolspaltung katalysiert durch die <i>N</i> -Acetylneuramisäurealdolase (NeuA). ....	21
<b>Schema 3.1:</b>	Synthetischer Zugang zu den weiteren <i>N</i> -modifizierten Aminosuckerderivaten <b>2-22</b> . Als Edukte wurden die Aminosucker <b>33-35</b> eingesetzt und mit den entsprechenden Reagentien zum gewünschten Derivat umgesetzt. ....	31
<b>Schema 3.2:</b>	Synthese der <i>N</i> -Methoxycarbonylderivate <b>5, 13</b> und <b>20</b> . Unter den standardmäßigen Reaktionsbedingungen kam es zu einer unerwünschten vollständigen Acetalisierung des anomeren C1-Atoms, daraus resultierten die Nebenprodukte <b>70</b> . Dadurch musste auch diese Syntheseroute modifiziert werden. ....	32
<b>Schema 3.3:</b>	Synthese der <i>N</i> -Methoxycarbonylderivate <b>5, 13</b> und <b>20</b> über die Route des entsprechenden <i>O</i> -Acyl-geschützten Aminosuckers <b>71</b> am Beispiel von <i>N</i> -Methoxycarbonylglucosamin <b>13</b> . ....	33
<b>Schema 3.4:</b>	Syntheseroute für die <i>N</i> -Propinoylderivate am Beispiel von <i>N</i> -Propinoylmannosamin <b>16</b> . ....	34
<b>Schema 3.5:</b>	Durch die terminale Alkinfunktionalität im <i>N</i> -Propinoylderivat <b>16</b> , welches als Michael-Akzeptor wirken kann, kommt es zur Bildung eines Produktgemisches mit dem Addukt <b>66</b> als Hauptkomponente. ....	35
<b>Schema 3.6:</b>	Mögliche Reaktionspfade zur Bildung des unerwünschten Nebenproduktes <b>66</b> . <b>[a]</b> Die Reaktion verläuft zunächst über die Aktivierung der Carbonsäure <b>60</b> mit DIC/HOBt zum gewünschten Produkt <b>16</b> ab. Da HOBt <b>63</b> während der Reaktion zurück gebildet wird, kann dies nun weiter mit dem Produkt <b>16</b> reagieren. <b>[b]</b> Alternativ es zunächst zu einer Reaktion zwischen einem Äquivalent der Propiolsäure <b>60</b> und zwei Äquivalenten HOBt <b>63</b> kommen. Das daraus resultierende ( <i>E</i> )-konfigurierte $\alpha,\beta$ -ungesättigte Carbonsäurederivat <b>67</b> reagiert nun mit dem Aminosucker <b>34</b> zum Addukt <b>66</b> . ....	36
<b>Schema 3.7:</b>	Modifizierte Synthese der <i>N</i> -Propinoylderivate am Beispiel von <b>16</b> aus dem entsprechenden Aminosucker <b>34</b> mit DIC <b>61</b> in Abwesenheit von HOBt <b>63</b> . ....	37
<b>Schema 3.8:</b>	Syntheseroute für PEP <b>1</b> ausgehend von Brenztraubensäure <b>46</b> . ....	39



<b>Schema 3.9:</b>	Möglicher Reaktionsmechanismus für die zweite Stufe der Synthese von PEP <b>1</b> . Bei der Reaktion wird eine $\alpha$ -Halogenketoverbindung <b>47</b> mit Trimethylphosphit <b>48</b> zum entsprechenden vinylischen Phosphorsäureester umgesetzt. <sup>[84]</sup> .....40
<b>Schema 3.10:</b>	Syntheseroute für den Acridongelabelten Akzeptor <b>23</b> : [a] Synthese von <i>N</i> -(Azidopentyl)acridon <b>50</b> , [b] Synthese von Alkynyl-Lactosid <b>49</b> und [c] CuAAC zwischen <b>49</b> und <b>50</b> . ....43
<b>Schema 3.11:</b>	Cu(I)-katalysierte Azid-Alkin-Cycloaddition (CuAAC) mit <i>N</i> -(Azidopentyl)acridon <b>50</b> ( <b>R</b> <sub>1</sub> ) und Alkynyl-Lactosid <b>49</b> ( <b>R</b> <sub>2</sub> ). ....44
<b>Schema 3.12:</b>	Schematische Darstellung des katalytischen Zyklus der Cu(I)-katalysierten Azid-Alkin-Cycloaddition (CuAAC) zur Synthese des Acridon-gelabelten Lactosylakzeptors <b>23</b> . ....46
<b>Schema 3.13:</b>	Mögliche Routen zur enzymatischen Synthese von Neu5Ac <b>87</b> mit der <i>N</i> -Acetylneuramin-säurealdolase NeuA <sub>Nme</sub> und den <i>N</i> -Acetylneuraminsäuresynthasen NeuS <sub>Nme</sub> und NeuS <sub>Cje</sub> . ....47
<b>Schema 3.14:</b>	Chemische Syntheseroute für das natürliche Substrat 6-Deoxy-AltdiNAc <b>51</b> der Pseudaminsäuresynthase PseS <sub>Cje</sub> . <sup>[107]</sup> Diese mehrstufige Synthese liefert das Produkt mit einer Gesamtausbeute über alle Stufen von 34%. ....51
<b>Schema 3.15:</b>	Präparative Synthesen mit den beiden PEP-abhängigen Synthasen PseS <sub>Cje</sub> und dem NeuB2-Protein, sowie den Zuckern <b>10</b> und <b>18</b> . ....52
<b>Schema 3.16:</b>	Von der NADH-abhängigen Oxidoreduktase Alanopindehydrogenase (AlpHD) katalysierte Gleichgewichtsreaktion. In der Rückreaktion kann L-Alanin <b>53</b> durch verschieden andere Aminosäuren ersetzt werden. ....57
<b>Schema 3.17:</b>	Präparative Synthesen mit der Pseudaminsäuresynthase PseS <sub>Cje</sub> . ....59
<b>Schema 3.18:</b>	Synthesewege mit den <i>N</i> -Acetylneuraminsäuresynthasen NeuS <sub>Nme</sub> und NeuS <sub>Cje</sub> am Beispiel des natürlichen Substrates [a] im gekoppelten System mit der von der <i>N</i> -Acetylglucosamin-2-Epimerase AGE <sub>Ava</sub> katalysierten, vorgeschalteten Epimerisierungsreaktion; [b] als 1-Enzymsystem. (* Puffer war 50 mM Bicin pH 8,0 mit 10 mM MnCl <sub>2</sub> ). ....61
<b>Schema 3.19:</b>	Aktivierung von <i>N</i> -Acetylneuraminsäure (Neu5Ac <b>87</b> ) durch die CTP-abhängige Sialatsynthase aus <i>Neisseria meningitidis</i> (CSS <sub>Nme</sub> ). ....66
<b>Schema 3.20:</b>	Synthese der CMP-aktivierten Sialinsäurederivaten mit der CSS <sub>Nme</sub> am Beispiel von 5- <i>epi</i> - <i>N</i> -Acetylneuraminsäure <b>24</b> . Das Produkt CMP-5- <i>epi</i> - <i>N</i> -Acetylneuraminsäure <b>58</b> wurde direkt in die Transferreaktion eingesetzt. ....68
<b>Schema 3.21:</b>	Enzymatischer Transfer von CMP-5- <i>epi</i> -Neu5Ac <b>58</b> auf den Acridon-gelabelten Lactosylakzeptor <b>23</b> mit der $\alpha$ 2,6-Sialyltransferase aus <i>Photobacterium leiognathi</i> ( $\alpha$ 2,6-SiaT <sub>Plc</sub> ). Die Produktisolierung erfolgte über RP <sub>18</sub> -Kieselgel. a: Reaktionslösung vor der Aufreinigung; b: Isoliertes Produkt <b>58</b> nach der Säule; c: Lactosylakzeptor <b>23</b> als Referenz. ....69
<b>Schema 3.22:</b>	Ablauf des Thiobarbitursäure-(TBA)-Assay. <sup>[130]</sup> Der aus dem oxidativen Spaltungsprodukt und Thiobarbitursäure entstehende Farbstoff wird in die organische Phase extrahiert und bei $\lambda = 549$ nm vermessen, um daraus die Konzentration der Sialinsäure <b>87</b> zu ermitteln. ....73
<b>Schema 3.23:</b>	Ablauf des Phosphat-Assays. Der während der Reaktion aus dem entstandenen Phosphat und dem Farbstoff Malachitgrün entstehende Komplex wird zur Detektion ( $\lambda = 646$ nm) und Quantifizierung der stöchiometrisch äquivalenten Sialinsäuremenge verwendet. ....74
<b>Schema 3.24:</b>	Von Knorst entwickelter Substrat-Recycling-Assay <sup>[69]</sup> zur Bestimmung einer Sialinsäurekonzentration als Basis für den im Rahmen dieser Arbeit entwickelten kontinuierlich gekoppelten Assay für Sialinsäuresynthasen. ....77

<b>Schema 3.25:</b>	Gekoppelter, kontinuierlicher Enzym-Assay, bestehend aus dem Recycling-Assay mit vorgeschalteter Epimerisierungsreaktion, katalysiert durch die <i>N</i> -Acetylglucosamin-2-Epimerase AGE <sub>Ava</sub> (EC 5.1.3.8).....	78
<b>Schema 3.26:</b>	Optimierung des Detektionssystems durch Variation der LDH-Menge und der Pyruvatkonzentration.....	80
<b>Schema 3.27:</b>	Optimierung des gekoppelten Systems durch Variation der eingesetzten Menge an <i>N</i> -Acetylneuraminsäurealdolase NeuA <sub>Nme</sub> bei unterschiedlichen Neu5Ac-Konzentrationen.....	81
<b>Schema 3.28:</b>	Optimierung des kompletten Recycling-Assays durch Variation der Menge an den <i>N</i> -Acetylneuraminsäuresynthasen NeuS <sub>Nme</sub> /NeuS <sub>Cje</sub> bei festen Konzentrationen der beiden natürlichen Substrate ManNAc <b>2</b> und PEP <b>1</b> .....	82
<b>Schema 3.29:</b>	Gekoppelter, kontinuierlicher Enzym-Assay bestehend aus dem Recycling-Assay mit vorgeschalteter Epimerisierungsreaktion, katalysiert durch die <i>N</i> -Acetylglucosamin-2-epimerase AGE <sub>Ava</sub> (EC 5.1.3.8). ....	96
<b>Schema 3.30:</b>	In <i>Campylobacter jejuni</i> von der PEP-abhängigen Pseudaminsäuresynthase PseS <sub>Cje</sub> katalysierte Kondensationsreaktion zwischen 6-Deoxy-AltdiNAc <b>51</b> und PEP <b>1</b> zur Pseudaminsäure <b>60</b> .....	127
<b>Schema 3.31:</b>	Mechanismus der von KDO8PS katalysierten Kondensationsreaktion zwischen Arabinose-5-phosphat <b>93</b> und Phosphoenolpyruvat <b>1</b> . Die Kondensationsreaktion verläuft stereospezifisch unter Ausbildung eines <i>R</i> -konfigurierten tetraedrischen Intermediats. <sup>[138]</sup> .....	136
<b>Schema 4.1:</b>	Gekoppelter, kontinuierlicher Enzym-Assay, bestehend aus dem Recycling-Assay mit vorgeschalteter Epimerisierungsreaktion, katalysiert durch die <i>N</i> -Acetylglucosamin-2-epimerase AGE <sub>Ava</sub> (EC 5.1.3.8). ....	168



## Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 3.1:</b>	Übersicht aller im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Zucker. Die Aminzuckerderivate <b>2-22</b> wurden über meist einstufige Routen aus den entsprechenden freien Aminosukcern synthetisiert. Die Zucker <b>33-45</b> waren käuflich erworben. ....	27
<b>Tabelle 3.2:</b>	Überblick über die erhaltenen Ausbeuten an <i>N</i> -modifizierten Derivaten aus den Synthesen der .....	38
<b>Tabelle 3.3:</b>	Überblick über die Ergebnisse für die in den Substrattests mit den beiden Synthesen NeuS <sub>Cje</sub> und PseS <sub>Cje</sub> eingesetzten Zucker. ....	49
<b>Tabelle 3.4:</b>	Präparativen Synthesen mit der Pseudaminsäuresynthase PseS <sub>Cje</sub> nach der säulenchromatographischen Isolierung der Produkte <b>24</b> und <b>25</b> . ....	54
<b>Tabelle 3.5:</b>	Die mit der Pseudaminsäuresynthase PseS <sub>Cje</sub> aus den Edukten <b>10</b> , <b>18</b> und <b>20</b> erhaltenen Produkte. ....	60
<b>Tabelle 3.6:</b>	Überblick über die besten Reaktionsbedingungen aus den Optimierungsstudien des gekoppelten Enzym-Systems. ....	62
<b>Tabelle 3.7:</b>	Ergebnisse der präparativen Synthesen mit dem gekoppelten System. ....	63
<b>Tabelle 3.8:</b>	Ergebnisse der Synthesen mit den <i>N</i> -Acetylneuraminsäuresynthasen NeuS <sub>Nme</sub> und NeuS <sub>Cje</sub> . ....	64
<b>Tabelle 3.9:</b>	Affinität der <i>N</i> -Acetylneuraminsäuresynthase NeuS <sub>Nme</sub> gegenüber ihren beiden natürlichen Substraten <i>N</i> -Acetylmannosamin <b>2</b> und Phosphoenolpyruvat <b>1</b> . Bestimmt mittels TBA-Assay. <sup>[9]</sup> ....	75
<b>Tabelle 3.10:</b>	Überblick über die Affinität, Aktivität und katalytische Effizienz der <i>N</i> -Acetylneuraminsäuresynthase NeuS <sub>Cje</sub> gegenüber den beiden natürlichen Substraten <i>N</i> -Acetylmannosamin <b>2</b> , Phosphoenolpyruvat <b>1</b> und <i>N</i> -modifizierter Mannosaminderivate, ermittelt mit dem Thiobarbitursäure (TBA)-Assay. <sup>[58]</sup> ....	76
<b>Tabelle 3.11:</b>	Überblick über die Ergebnisse aus der Optimierung des Recycling-Assays für beide <i>N</i> -Acetylneuraminsäuresynthasen NeuS <sub>Nme</sub> und NeuS <sub>Cje</sub> . ....	83
<b>Tabelle 3.12:</b>	Kinetische Vermessung der natürlichen Substrate ManNAc <b>2</b> und PEP <b>1</b> in Küvetten mit Dreifachmessung pro Konzentration gegen eine Negativkontrolle. ....	84
<b>Tabelle 3.13:</b>	Affinität, Aktivität, katalytische Effizienz und massenspezifische Aktivität der beiden <i>N</i> -Acetylneuraminsäuresynthasen NeuS <sub>Nme</sub> und NeuS <sub>Cje</sub> gegenüber dem natürlichen Substrat PEP <b>1</b> . ....	86
<b>Tabelle 3.14:</b>	Affinität, Aktivität, katalytische Effizienz und massenspezifische Aktivität der beiden <i>N</i> -Acetylneuraminsäuresynthasen NeuS <sub>Nme</sub> und NeuS <sub>Cje</sub> gegenüber dem natürlichen Substrat ManNAc <b>2</b> . ....	88
<b>Tabelle 3.15:</b>	Vergleich der kinetischen Daten für die beiden natürlichen Substrate PEP <b>1</b> und ManNAc <b>2</b> . ....	88
<b>Tabelle 3.16:</b>	Ansätze für die Vermessung der <i>N</i> -acylierten Mannosaminderivate mit den beiden <i>N</i> -Acetylneuraminsäuresynthasen NeuS <sub>Nme</sub> und NeuS <sub>Cje</sub> . ....	90
<b>Tabelle 3.17:</b>	Affinität, Aktivität, katalytische Effizienz und massenspezifische Aktivität der beiden <i>N</i> -Acetylneuraminsäuresynthasen NeuS <sub>Nme</sub> und NeuS <sub>Cje</sub> gegenüber den Substraten <b>3-9</b> sowie dem natürlichen Substrat <i>N</i> -Acetylmannosamin <b>2</b> im Überblick. ....	94
<b>Tabelle 3.18:</b>	Ansatzgrößen zur Bestimmung der kinetischen Daten der Glucosaminderivate in der Küvette und der 96-Lochplatte. Wichtigste Änderungen gegenüber den Mannosaminderivaten waren höhere Konzentrationen der Substrate und größere Enzymmengen. ....	102
<b>Tabelle 3.19:</b>	Affinität, Aktivität, katalytische Effizienz und massenspezifische Aktivität der beiden .....	107

<b>Tabelle 3.20:</b>	Affinität, Aktivität, katalytische Effizienz und massenspezifische Aktivität der beiden <i>N</i> -Acetylneuraminsäuresynthasen NeuS <sub>Nme</sub> und NeuS <sub>Cje</sub> gegenüber den Substraten <b>18-22</b> sowie dem natürlichen Substrat <i>N</i> -Acetylmannosamin <b>2</b> im Überblick.....	113
<b>Tabelle 3.21:</b>	Ansatzgrößen zur Bestimmung der kinetischen Daten der Aminosucker <b>33-35</b> für Messungen .....	115
<b>Tabelle 3.22:</b>	Affinität, Aktivität, katalytische Effizienz und massenspezifische Aktivität der beiden <i>N</i> -Acetylneuraminsäuresynthasen NeuS <sub>Nme</sub> und NeuS <sub>Cje</sub> gegenüber den Aminosuckern Mannosamin <b>33</b> , Glucosamin <b>34</b> und Galactosamin <b>35</b> sowie dem natürlichen Substrat <i>N</i> -Acetylmannosamin <b>2</b> .....	119
<b>Tabelle 3.23:</b>	Affinität, Aktivität, katalytische Effizienz und massenspezifische Aktivität der beiden <i>N</i> -Acetylneuraminsäuresynthasen NeuS <sub>Nme</sub> und NeuS <sub>Cje</sub> gegenüber den Zuckern <b>36-43</b> sowie dem natürlichen Substrat <i>N</i> -Acetylmannosamin <b>2</b> im Überblick. 2-Deoxy-D-Ribose <b>44</b> wird nicht als Substrat akzeptiert.....	125
<b>Tabelle 3.24:</b>	Affinität, Aktivität, katalytische Effizienz und massenspezifische Aktivität der Pseudaminsäuresynthase PseS <sub>Cje</sub> gegenüber dem natürlichen Substrat PEP <b>1</b> und den <i>N</i> -acylierten Aminosuckerderivaten <b>10</b> und <b>18-22</b> im Überblick. ....	133
<b>Tabelle 3.25:</b>	Überblick über die Resultate des Aminosäuresequenzvergleiches zwischen den einzelnen PEP-abhängigen Synthasen.....	138
<b>Tabelle 3.26:</b>	Überblick über die in präparativen Synthesen mit der NeuS <sub>Nme</sub> eingesetzten Substrate. Für einen besseren Vergleich sind neben den Ausbeuten auch die hier bestimmten $K_M$ - und $k_{cat}$ -Werte der jeweiligen Substrate angegeben. Elektronische und konfigurative Änderungen in den Substraten gegenüber dem natürlichen Substrat ManNAc <b>2</b> sind <b>rot</b> hervorgehoben. ....	155
<b>Tabelle 3.27:</b>	Überblick über die auch in präparativen Synthesen mit PseS <sub>Cje</sub> eingesetzten Substrate, für einen besseren Vergleich sind neben den Ausbeuten auch die $K_M$ -Werte der jeweiligen Substrate angegeben. Elektronische und konfigurative Änderungen in den Substraten gegenüber dem natürlichen Substrat 6-Deoxy-AltdiNAc <b>51</b> sind <b>rot</b> hervorgehoben.....	163
<b>Tabelle 4.1:</b>	Synthese <i>N</i> -modifizierter Aminosuckerderivate. ....	166
<b>Tabelle 4.2:</b>	Ergebnisse der Synthesen mit den Synthasen NeuS <sub>Nme</sub> , NeuS <sub>Cje</sub> und PseS <sub>Cje</sub> .....	167

---

## Abkürzungsverzeichnis

---

AAV	Allgemeine Arbeitsvorschrift
Abb.	Abbildung
Abs.	Absolut
Ac	Acetyl
AcOH	Essigsäure
Acr	Acridon
AGE	<i>N</i> -Acetylglucosamin-2-epimerase
AgOTf	Silbertriflat
AK	Arbeitskreis
Äq.	Äquivalent
Ausb.	Ausbeute
ax	axial
Bicin	<i>N,N'</i> -Bis(2-hydroxyethyl)glycin
BSA	Rinderserumalbumin (Bovine serum albumine)
BuOH	Butanol
C	Chloroform
CDP	Cytidin-5`-diphosphat
CIAP	alkalische Phosphatase
<i>C. jejuni</i>	<i>Campylobacter jejuni</i>
CMP	Cytidin-5`-monophosphat
CMP-Neu5Ac	Cytidin-5`-monophosphat- <i>N</i> -Acetylneuraminsäure
CMP-5- <i>epi</i> -Neu5Ac	Cytidin-5`-monophosphat-5- <i>epi</i> - <i>N</i> -Acetylneuraminsäure
CMP-5,7- <i>bisepi</i> -Neu5Ac	Cytidin-5`-monophosphat-5,7- <i>bisepi</i> - <i>N</i> -Acetylneuraminsäure
CSS	CMP-Sialat-Synthase
CTP	Cytidin-5`-triphosphat
CuAAC	Copper Catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition (Kupfer-katalysierte Azid-AlkinCycloaddition)
Cy	Cyclohexan
Cy.	Cytidin
δ	chemische Verschiebung
d	Dublett (Spektrenzuordnung)

---

d	Tag(e)
DC	Dünnschichtchromatographie
DCM	Dichlormethan
dd	Dublett von Dublett (Spektrenzuordnung)
DIC	Diisopropylcarbodiimid
DMF	<i>N,N'</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EC	Enzyme Commission (Einheitliche Klassifizierung von Enzymen nach Enzymklassen und –nummern)
EE	Essigsäureethylester
ESI-MS	Elektronensprayionisation-Massenspektrometrie
Et <sub>3</sub> N	Triethylamin
Et <sub>2</sub> O	Diethylether
EtOH	Ethanol
eq	äquatorial
Fuc	D-Fucose
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
Gal	D-Galactose
GalNAc	<i>N</i> -Acetylgalactosamin
GalNH <sub>2</sub> *HCl	D-Galactosamin-Hydrochlorid
ges.	gesättigt
Glc	D-Glucose
GlcNAc	<i>N</i> -Acetylglucosamin
GlcNH <sub>2</sub> *HCl	D-Glucosamin-Hydrochlorid
GPC	Gelpermeationschromatographie
h	Stunde(n)
HOBt	1-Hydroxy-benzotriazol
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HV	Hochvakuum
i. Vak.	im Vakuum
<i>J</i>	Kopplungskonstante
Kap.	Kapitel
<i>k<sub>cat</sub></i>	katalytische Geschwindigkeit

$k_{cat}/K_M$	katalytische Effizienz
KDN	3-Deoxy-D- <i>glycero</i> -D- <i>galacto</i> -2-nonulosonsäure
$K_M$	Michaelis-MentenKonstante (Substrataffinität)
konz.	konzentriert
Lac	D-Lactose
LDH	NADH-abhängige Lactatdehydrogenase
Leg	Legionaminsäure
Lissamin <sup>TM</sup>	Lissamingrün B
LM	Laufmittel
Lyx	D-Lyxose
M	mol/L
m	Multiplett (Spektrenzuordnung)
$m/z$	Masse/Ladungszahl (Massenspektrometrie)
Man	D-Mannose
ManNAc	<i>N</i> -Acetylmannosamin
ManNH <sub>2</sub> <sup>*</sup> HCl	D-Mannosamin-Hydrochlorid
MeOH	Methanol
min.	Minute(n)
mM	mmol/L
MS	Massenspektrum
<i>N. meningitidis</i>	<i>Neisseria meningitidis</i>
Na-Ascorbat	Natriumascorbat
NAD <sup>+</sup>	$\beta$ -Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid (oxidierte Form)
NADH	$\beta$ -Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid (reduzierte Form)
NaOMe	Natriummethanolat
NeuA	<i>N</i> -AcetylneuraminsäureAldolase
Neu5Ac	<i>N</i> -Acetylneuraminsäure
NeuS	<i>N</i> -AcetylneuraminsäureSynthase (allgemein)
NeuS <sub>Cje</sub>	<i>N</i> -AcetylneuraminsäureSynthase (aus <i>Campylobacter jejuni</i> )
NeuS <sub>Nme</sub>	<i>N</i> -AcetylneuraminsäureSynthase (aus <i>Neisseria meningitidis</i> )
NH <sub>2</sub> -	Amino-
NMR	Nuclear Magnetic Resonance (magnetische Kernresonanz)
OAc	Acetat
OD <sub><math>\lambda = 340</math> nm</sub>	Absorptionsdaten bei einer Wellenlänge von 340 Nanometer

---

OH	Hydroxyl
PEP	Phosphoenolpyruvat
PK	Pyruvatkinase
P <sub>i</sub>	anorganisches Phosphat
pK <sub>a</sub>	negativer dekadischer Logarithmus der Säurekonstante ( <i>K</i> <sub>a</sub> )
PP <sub>ase</sub>	anorganische Pyrophosphatase
PP <sub>i</sub>	anorganisches Pyrophosphat
Pse	Pseudaminsäure
R <sub>f</sub>	Rückhaltefaktor (Dünnschichtchromatographie)
RP	Reversed Phase (Umkehrphase)
RT	Raumtemperatur
RZ	Reaktionszeit
s	Singulett (Spektrenzuordnung)
SDS	Natriumdodecylsulfat
Sia	Sialinsäure
SiaT	Sialyltransferase (α-2,6-)
t	Triplett (Spektrenzuordnung)
THF	Tetrahydrofuran
TMS	Tetramethylsilan
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)1,3-propandiol
U	Unit (1 Unit = 1 μmol Umsatz/min)
v <sub>max</sub>	maximale Geschwindigkeit
v/v	volume per volume
WW	Wechselwirkung
w/v	weight per volume

---

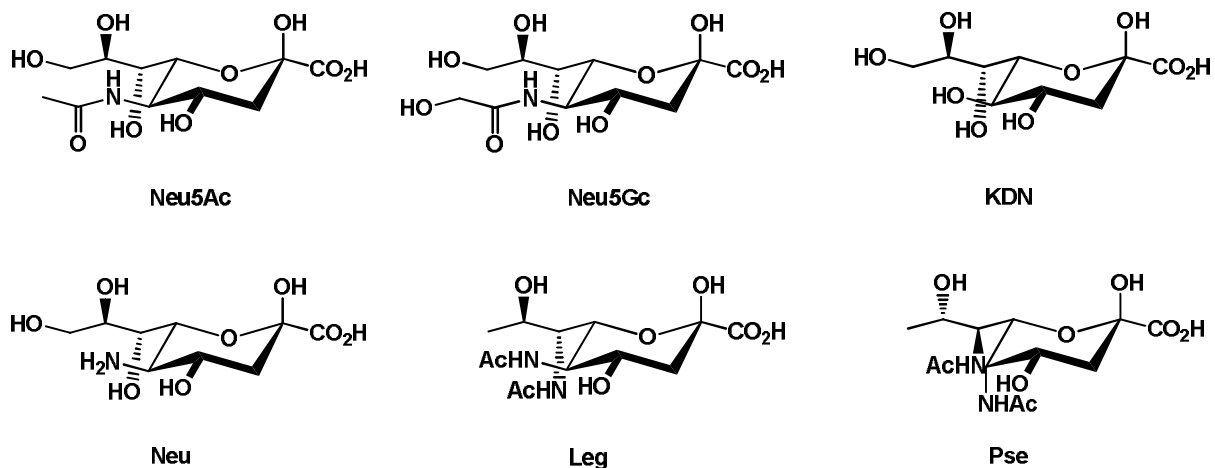
# 1 Einleitung

---

## 1.1 Vorkommen und Eigenschaften von Sialinsäuren in der Natur

Sialinsäuren (Sia) sind eine große Untergruppe der Nonulosonsäuren, einer Familie von 9-Kohlenstoffzuckersäuren mit einer  $\alpha$ -Ketofunktionalität.<sup>[1-2]</sup> In der Natur vorkommende sialinsäurehaltige Strukturen können mit verschiedenen Sialinsäurederivaten versehen sein, welche alle  $\alpha$ -glycosidisch ( $\alpha$ -2,n; n = 3,6,8 oder 9) an eine Vielfalt von Glycanen und Glycoproteinen gebunden sind.<sup>[3]</sup> Sialinsäuren spielen eine wichtige Rolle in biologischen, pathologischen und immunologischen Prozessen.<sup>[4]</sup> Mitte der ersten Hälfte des 20. Jahrhunderts wurde von Blix eine der häufigsten und wichtigsten Sialinsäuren, die 5-Acetoamido-D-glycero-D-galacto-2-nonulonsäure (Neu5Ac), durch milde Hydrolyse aus Speicheldrüsen-Mycin des Rindes in kristalliner Form isoliert.<sup>[5-6]</sup> Bis heute wurden über 50 verschiedene Sialinsäuren und deren Derivate in der Natur entdeckt.<sup>[4]</sup> Einige Strukturen davon finden sich im Menschen, vor allem in Erythrozyten, Speichel-Proteinen und Magen-Darm-Mucinen,<sup>[7-8]</sup> desweiteren kommen sie in höheren Wirbeltieren, kleinen Säugetieren und einigen Mikroorganismen vor. Unter diesen Mikroorganismen befinden sich insbesondere einige Humanpathogene, wie *Neisseria meningitidis*<sup>[9]</sup>, *Campylobacter jejuni*<sup>[10-11]</sup> und *Legionella pneumophila*.<sup>[12]</sup> Die häufigsten Vertreter der Gruppe der Sialinsäuren (Abb. 1.1) sind neben der N-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac), 3-Deoxy-D-glycero-D-galacto-2-nonulonsäure (KDN)<sup>[13]</sup>, N-Glycolylneuraminsäure (Neu5Gc)<sup>[14-15]</sup>, Neuraminsäure (Neu). Daneben gibt es noch die unter anderem in Lipopolysacchariden (LPS) von *Campylobacter jejuni* 11168 vorkommende 5,7-Diacetamido-L-glycero-L-manno-nonulonsäure (Pseudaminsäure, Pse)<sup>[16]</sup> sowie die 5,7-Diacetamido-D-glycero-D-galacto-nonulonsäure (Legionaminsäure, Leg)<sup>[12, 16]</sup>, welche in

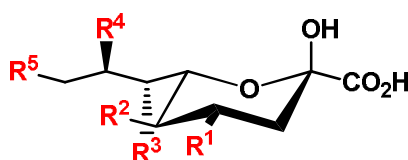
den LPS von *Legionella pneumophila* serogroup 1 zu finden ist. Die Legionaminsäure (Leg)<sup>[12, 16-17]</sup> gehört aufgrund ihrer D-glycero-D-galacto-Konfiguration zu den „echten“ Sialinsäuren, wohingegen die Pseudaminsäure (Pse)<sup>[16-17]</sup> aufgrund ihrer L-glycero-L-manno-Konfiguration ein Stereoisomer von Neu5Ac und KDN ist.<sup>[16-17]</sup>



**Abbildung 1.1:** Übersicht über die wichtigsten in Wirbeltieren und Mikroorganismen vorkommenden Sialinsäuren.

Die enorme strukturelle Vielfalt der natürlichen Sialinsäuren resultiert aus den mannigfaltigen Möglichkeiten der Derivatisierung an den in Abbildung 1.1 gezeigten Strukturen. Sie können eine große Vielzahl an verschiedenen Substituenten an der Amino- und den Hydroxygruppen tragen.<sup>[14]</sup> So kann die Aminogruppe von Neuraminsäure (Neu) acetyliert oder glycosyliert sein, während alle anderen nicht-glycosidischen Hydroxygruppen eine Acetylgruppen tragen können. Des Weiteren findet man an Position O-9 Lactol- oder Phosphorylreste (Neu5Ac9P)<sup>[14]</sup>, Methyl- und Sulfonylreste vor allem an Position O-8, und eine Kombination dieser O-9/O-8-Derivatisierung erweitert nochmals das Spektrum (Abb. 2)<sup>[14]</sup>. Abgesehen von den erwähnten Sialinsäuren konnten in einigen anderen biologischen Quellen weitere Sialinsäurederivate identifiziert werden, die mit einer inter- oder intramolekularen Hydroxylgruppe zum Lacton oder über die freie Amino-Gruppe an C-5 in der Neuraminsäure (Neu) intramolekular zum Lactam kondensieren. Die ungesättigte 2-Deoxy-2,3-didehydro--D-glycero-D-galacto-2-nonulonsäure (Neu2en5Ac) kommt aufgrund der fehlenden  $\alpha$ -Ketogruppe nur in freier Form vor.<sup>[18]</sup>





**R<sup>1</sup>:** O-Acetyl

**R<sup>2</sup>:** N-Acetyl; N-Glycolyl; Hydroxyl

**R<sup>3</sup>:** O-Acetyl

**R<sup>4</sup>:** O-Acetyl; O-Methyl; O-Sulfonat

**R<sup>5</sup>:** O-Acetyl; O-Lactyl; O-Phosphat

**R<sup>3</sup>/R<sup>4</sup>:** 7,8-di-O-Acetyl

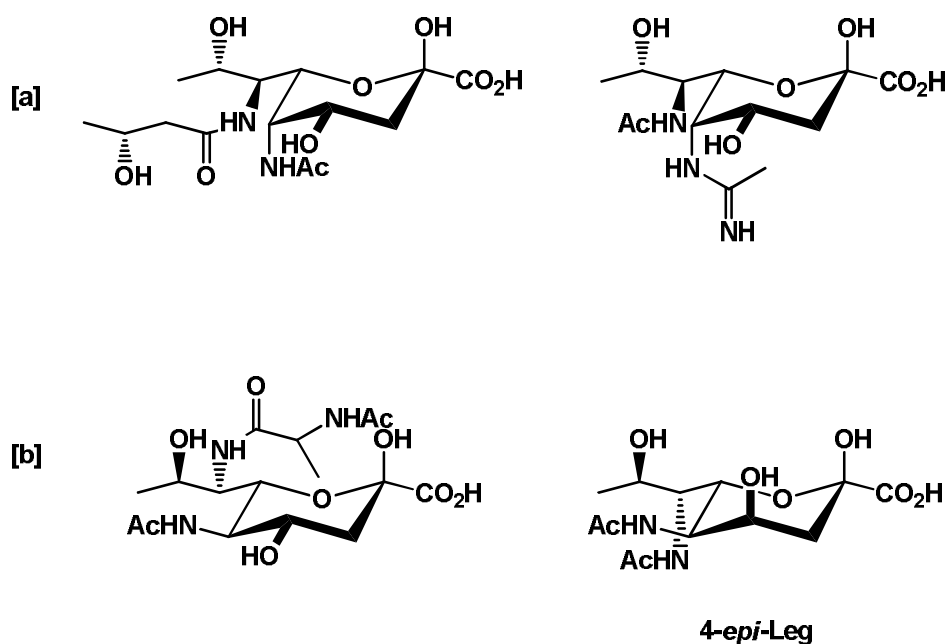
**R<sup>3</sup>/R<sup>5</sup>:** 7,9-di-O-Acetyl

**R<sup>4</sup>/R<sup>5</sup>:** 8,9-di-O-Acetyl

**R<sup>3</sup>/R<sup>4</sup>/R<sup>5</sup>:** 7,8,9-tri-O-Acetyl

**Abbildung 1.2:** Bekannte strukturelle Modifikationen der Neuraminsäure (Neu). <sup>[1,14]</sup>

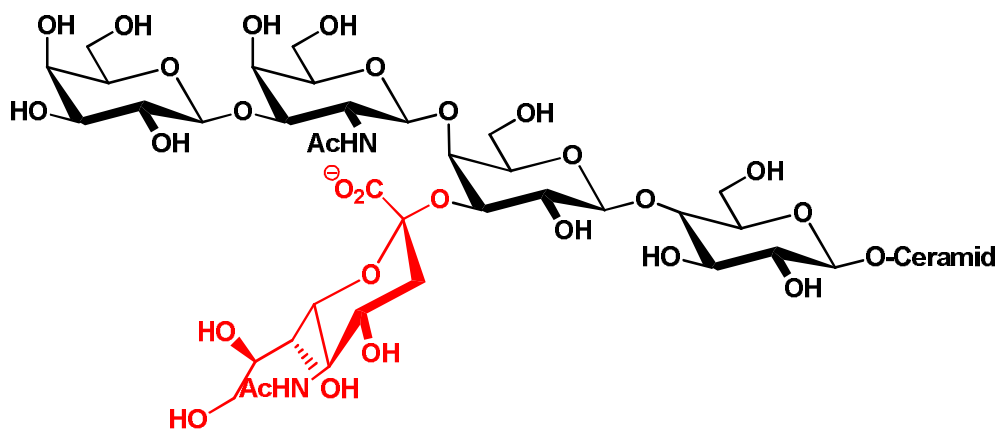
Bei der Pse und der Leg, den beiden wichtigsten Vertretern einer weiteren Subklasse von Sialinsäuren, deren Vorkommen sich allem Anschein nach nur auf Mikroorganismen (pathogene und nicht-pathogene) beschränkt, konnten ebenfalls eine Vielzahl von Strukturvariationen an den beiden Stickstoffatomen N-5 und N-7 identifiziert werden (Abbildung 1.3).<sup>[16]</sup>



**Abbildung 1.3:** Beispiele von bekannten Derivaten [a] der Pseudaminsäure und [b] der Legionnamsäure.<sup>[16]</sup>

Als anionische Monosaccharideinheiten leisten Sialinsäuren einen großen Beitrag zur enormen strukturellen Diversität von komplexen Kohlenhydraten<sup>[19]</sup>, wo man sie meist als terminale Einheit findet, aber auch als interne Einheit auf unterschiedlichste Art glycosidisch-verknüpft mit Oligosacchariden, Polysacchariden (PSA), Glycoproteinen,

Gangliosiden (Abb. 4) und Lipooligosacchariden (LPS), auf der Zellmembran oder als Bestandteil eines sekretierten Makromoleküls <sup>[14, 20]</sup>



**Abbildung 1.4:** Struktur des humanen Gangliosides GM1 mit  $\alpha$ -2,3-verknüpften *N*-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac). Basis des Gangliosides ist eine Sphingolipideinheit (Ceramid), an diese schließt sich eine Oligosaccharidkette an, bestehend aus unterschiedlichen Zuckern. Neben Glucose und Galactose findet sich auch *N*-Acetylglucosamin in der Kette. Neben einem terminalen Galactoserest besitzt das Gangliosid zusätzlich eine terminale *N*-Acetylneuraminsäure.

Das Gangliosid GM 1 gehört zur Familie der Monosialotetrahexosylganglioside<sup>[21]</sup> mit einer Sialinsäureeinheit in der Struktur und ist in großer Anzahl auf der äußeren Zellmembran von Nervenzellen zu finden. Er übernimmt wichtige physiologische Eigenschaften und ist ausschlaggebend an der neuronalen Plastizität von Nervenzellen und Synapsen und deren Reparaturmechanismen beteiligt, sowie an der Freisetzung von Neurotrophinen im Gehirn.<sup>[21]</sup> Neben diesen physiologischen Aufgaben dient GM1 aber auch als Andockstelle für pathogene Virulenzfaktoren, unter anderem für Cholera-Toxin, einem multimeren Proteinkomplex, welcher von dem Bakterium *Vibrio cholerae* sekretiert wird.<sup>[22]</sup> CholeraToxin ist verantwortlich für die bei einer Cholerainfektion auftretende massive wässrige Diarrhoe.

Die glykosidische Verknüpfung der Sialinsäuren mit diesen Makromolekülen ist wie erwähnt vielfältig. Hierbei dient eine intermediär gebildete  $\beta$ -konfigurierte CMP-aktivierte Sialinsäure als Donor, diese wird mit einer organismus-spezifischen Sialyltransferase  $\alpha$ -selektiv auf den entsprechenden Akzeptor übertragen. Als terminale Einheit im Glykan auf der Zelloberfläche von Säugetieren erfolgt die Verknüpfung meist  $\alpha$ -2,3 (auf einen Galactoserest) und  $\alpha$ -2,6 (auf einen Galactose- oder GalNAc-Rest).<sup>[23-24]</sup> Weitere in der Literatur beschriebene terminale und interne Verknüpfungsmöglichkeiten sind  $\alpha$ -2,4 auf Gal/GlcNAc<sup>[25-26]</sup>, sowie  $\alpha$ -2,8 und  $\alpha$ -2,9 auf andere Sialinsäureeinheiten.<sup>[17, 27]</sup>

---

Somit wird nicht nur durch die biosynthetischen Variationen der Sialinsäure an sich, sondern auch durch die vielen unterschiedlichen Verknüfungspositionen die Diversität der Glycanketten weiter erhöht und somit auch die Bandbreite an komplexen Kohlenhydraten.<sup>[4]</sup> Aufgrund ihrer exponierten Stellung in diesen Makromolekülen spielen Sialinsäuren eine wichtige regulatorische und protektive Rolle in physiologischen als auch in pathologischen Prozessen. Man nimmt an, dass ihre Anwesenheit erst die Entwicklung von höheren Organismen erleichterte und förderte.<sup>[1]</sup> Durch ihre negative Ladung unterstützen Sialinsäuren Ionentransporte durch die Zellmembran und erhöhen die Stabilität der Konformation von Proteinen.<sup>[28]</sup> Des Weiteren dienen Sialinsäuren Molekülen und Zellen als „biologische Maske“ für wichtige Erkennungsstellen.<sup>[29]</sup> Als terminaler oder fast terminaler Bestandteil der Glycankette können sie Zellen vor dem Angriff des Immunsystems schützen, indem sie zum Beispiel die Erkennungsstelle in der Antigenstruktur auf der Zellmembran blockieren, oder die Erkennungsstelle für proteolytische Enzyme wie Proteasen und Glycosidasen.<sup>[29]</sup> Sie regulieren die Affinität von Rezeptoren, spielen eine wichtige Rolle in transmembranen Signalprozessen und modulieren die Zellteilung. Bei der Regulation der natürlichen Lebensspanne von Zellen sind sie beteiligt, wobei zum Beispiel der programmierte Zelltod (Apoptose) durch O-acetylierte Sialinsäuren verhindert werden kann.<sup>[17]</sup> Auch der Grad der Sialylierung spielt eine wichtige Rolle bei der Metastasierung von Krebszellen und der Ausbreitung von Pathogenen. So ist zum Beispiel Neu5Gc neben der ubiquitär vorkommenden Neu5Ac eine der am häufigsten auftretenden Sialinsäuren. Man findet sie ausschließlich in tierischen Geweben und nicht in gesundem menschlichem Gewebe, jedoch konnte sie in hoher Konzentration auf der Oberfläche von Tumorzellen identifiziert werden. Somit gibt es fast keine biologischen Ereignisse, in denen diese promiskuitiven Komponenten nicht involviert sind. Ein Fehler in ihrer Biosynthese oder ihrem Abbau hat schwerwiegende biologische Konsequenzen und kann unter anderem zu Krankheiten wie Krebs führen.<sup>[1]</sup> Im Laufe der Evolution haben pathogene Mikroorganismen, wie z.B. *Campylobacter jejuni* oder *Legionella pneumophila* vielfältige Möglichkeiten entwickelt, diese auf der Zelloberfläche leicht zugänglichen Sialinsäurebausteine als Anker zum Anhaften und darauffolgendem Infizieren der Zelle, zum Zerstören der sauren Schutzhülle der Zelle durch Sekretion von hydrolytischen Enzymen zu nutzen<sup>[1]</sup>, oder diese Organismen tarnen sich mit Hilfe von Sialinsäuren, indem sie diese in sich wiederholende Einheit am Terminus ihrer Lipooligosaccharide (LOS) installieren.<sup>[30]</sup> Dadurch erreichen sie einen sehr hohen Sialylierungsgrad auf ihrer Zelloberfläche, was es dem humanen Immunsystem unmöglich

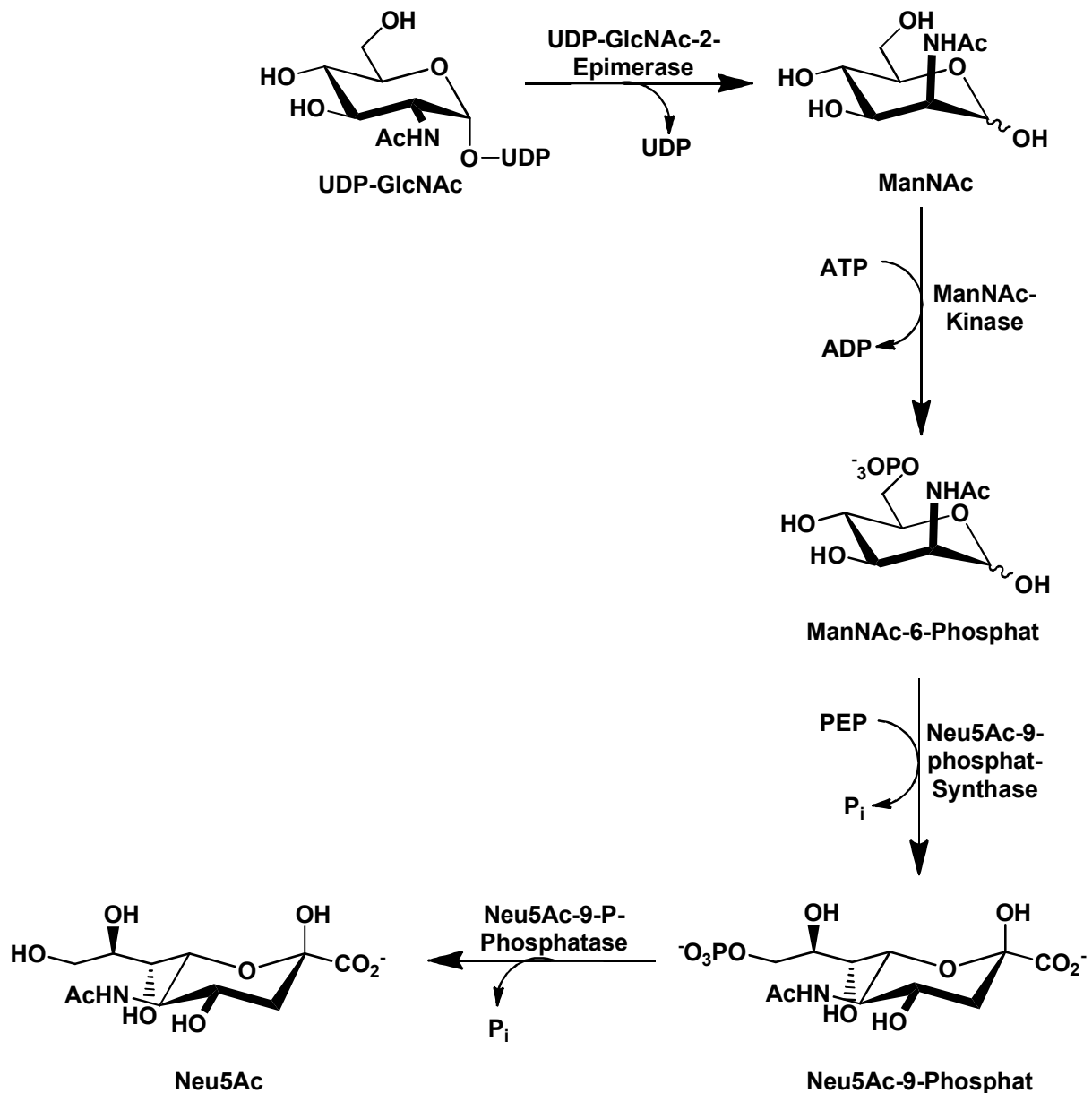
---

macht, zwischen zum Beispiel menschlichen Gangliosiden auf der Zelloberfläche und dem pathogenen Mikroorganismus zu unterscheiden.<sup>[30]</sup>

## **1.2 Metabolismus der Sialinsäuren**

### **1.2.1 *N*-Acetylneuraminsäure-Metabolismus in Säugern**

Die Biosynthese der *N*-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac) in Säugetierzellen läuft über vier Stufen ab, an denen unterschiedliche spezifische Enzyme beteiligt sind (Schema 1.1).<sup>[31-32]</sup> Im ersten Schritt wird UDP-*N*-Acetylglucosamin (UDP-GlcNAc) mit Hilfe der UDP-*N*-Acetylglucosamin-2-Epimerase (UDP-GlcNAc-2-Epimerase; E.C. 5.1.3.14) zu *N*-Acetylmannosamin (ManNAc) hydrolysiert, das ManNAc wird nun mit der *N*-Acetylmannosamin-Kinase (ManNAc-Kinase; E.C. 2.7.1.60) in Gegenwart von ATP an der O6-Position phosphoryliert. Das entstandene *N*-Acetylmannosamin-6-Phosphat (ManNAc-6-P) wird im vorletzten Schritt mit der 9-Phospho-*N*-Acetylneuraminsäure-Synthase (Neu5Ac-9-Phosphat-Synthase; E.C. 2.5.1.57) und Phosphoenolpyruvat (PEP) zum 9-Phosphat der *N*-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac-9-P) unter Abspaltung von anorganischem Phosphat umgesetzt. Im finalen Schritt erfolgt eine Dephosphorylierung des Neu5Ac-9-Phosphat mit der *N*-Acetylneuraminsäure-9-Phosphat-Phosphatase (Neu5Ac-9-P-Phosphatase; E.C. 3.1.3.29) zur entsprechenden *N*-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac).

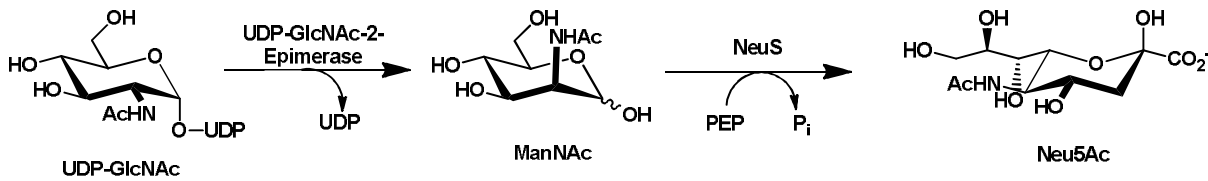


**Schema 1.1:** Biosyntheseweg der *N*-Acetylneuraminsäure Neu5Ac in Säugetieren.

### 1.2.2 Sialinsäuremetabolismus in pathogenen Organismen

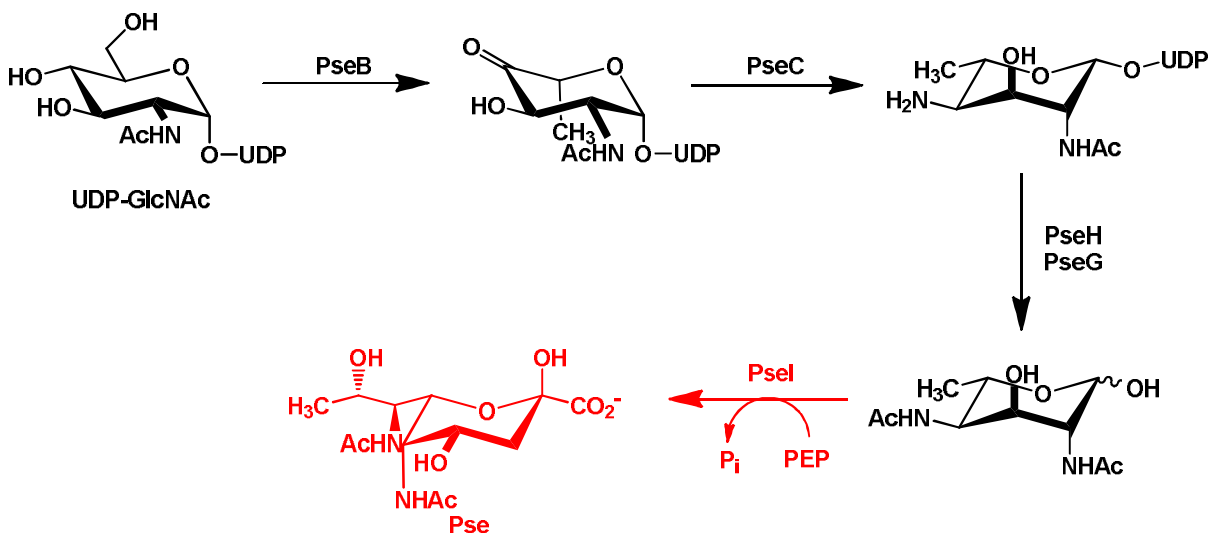
Die Biosynthese der Sialinsäuren in Bakterien verläuft auf einem anderen enzymatischen Weg als dem in Säugetieren. Die enzymatische Synthese von *N*-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac) zum Beispiel in *Neisseria meningitidis* serogroup 1<sup>[9]</sup> läuft nur über zwei Stufen, wobei im Vergleich der Phosphorylierungs- und der Dephosphorylierungsschritt im Säugetiermetabolismus wegfallen. Ausgehend von UDP-GlcNAc wird im ersten Schritt mit Hilfe der UDP-GlcNAc-2-Epimerase ManNAc synthetisiert und dieses im zweiten Schritt

zusammen mit PEP durch die *N*-Acetylneuraminsäure-Synthase (NeuS<sub>Ne</sub>; E.C. 2.5.1.56) in einer Kondensationsreaktion direkt in Neu5Ac umgewandelt (Schema 1.2).<sup>[9, 33-35]</sup>



**Schema 1.2:** Biosyntheseweg zu *N*-Acetylneuraminsäure **Neu5Ac** in pathogenen Mikroorganismen.

Der komplette Biosyntheseweg zur Pseudaminsäure (Pse) ist inzwischen aufgeklärt.<sup>[16, 36-37]</sup> Die Biosynthese von Pse verläuft aufwändiger über vier Stufen, an denen fünf unterschiedliche Enzyme beteiligt sind (Schema 1.3).



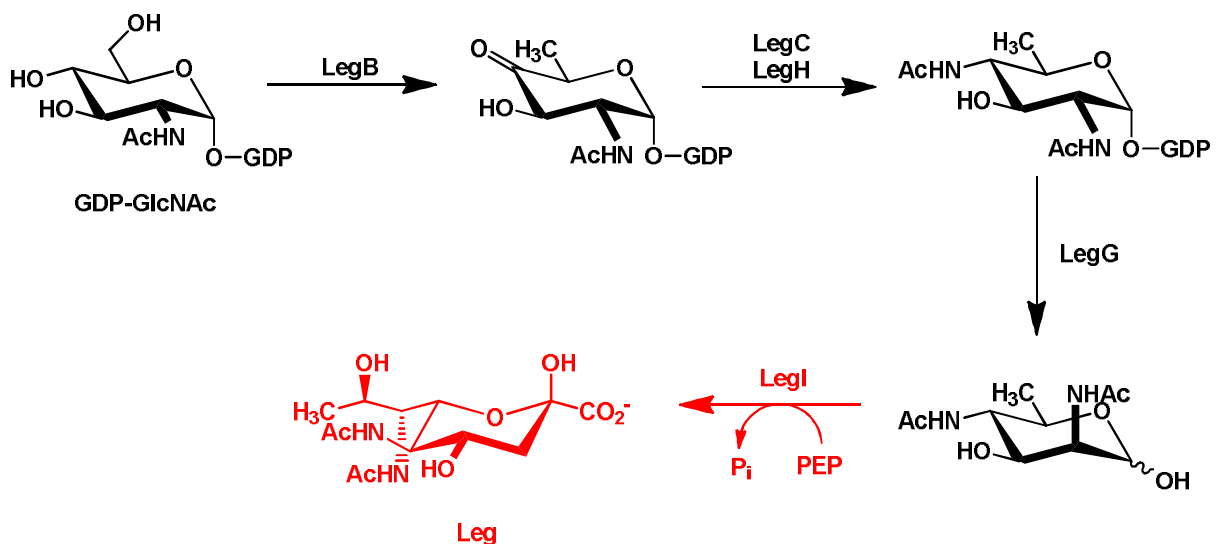
**Schema 1.3:** Biosyntheseweg der Pseudaminsäure (Pse) in *Campylobacter jejuni* ausgehend von UDP-*N*-Acetylglucosamin.<sup>[16, 37]</sup>

Ausgangspunkt der Synthese ist wiederum UDP-GlcNAc, welches im ersten Schritt zu UDP-2-acetamido-2,6-dideoxy- $\beta$ -D-*arabino*-4-hexosulose umgesetzt wird. Das daran beteiligte Enzym PseB<sup>[16]</sup> besitzt eine duale Funktionalität, es ist zum einen eine NAD(P)-abhängige Dehydratase, zum anderen eine C-5 Epimerase. Den zweiten Schritt katalysiert ein Enzym PseC, welches den vorhandenen D-Zucker unter Einfügen einer Amino-Gruppe an der C-4 Position in den entsprechenden L-Zucker UDP-4-amino-4,6-dideoxy- $\beta$ -L-AltNAc umwandelt.<sup>[16, 37]</sup> Dieses Intermediat durchläuft nun eine Stufe die von zwei Enzymen PseH und PseG katalysiert wird. Zum einen erfolgt eine

Acetylierung der an C4-lokalisierten Aminogruppe und das anomere Zentrum wird durch Hydrolyse frei gesetzt.

Die entstehende 2,4-Diacetamido-2,4,6-trideoxy- $\beta$ -L-Altropyranose (AltdiNAc) dient nun in der letzten Stufe der oben erwähnten Pseudaminsäuresynthase (PseS) als Edukt und wird mit PEP zusammen in einer aldol-artigen Kondensation unter Freisetzung von anorganischem Phosphat zur Pseudaminsäure (Pse)<sup>[16]</sup> umgesetzt.

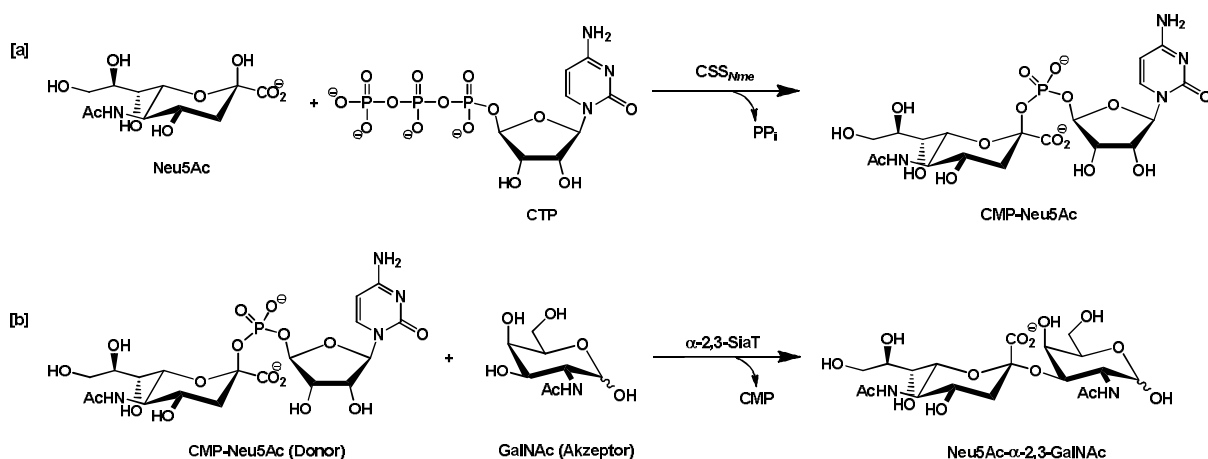
Die Legionaminsäure (Leg)<sup>[16, 38]</sup> ist eine weitere Sialinsäure, die in exponierter Stellung in den Lipooligosacchariden (LOS) vieler Mikroorganismen zu finden ist. Darunter sind *Campylobacter jejuni*<sup>[16, 39]</sup> und *Helicobacter pylori*.<sup>[16]</sup> Auch deren Biosyntheseweg konnte vollständig charakterisiert werden, wobei er in *Campylobacter jejuni* analog dem Pseudaminsäureweg (Schema 1.4) verläuft, nur die katalytische Reihenfolge im zweiten und dritten Schritt unterscheiden sich.



**Schema 1.4:** Legionaminsäurebiosynthese in *Campylobacter jejuni*.<sup>[16]</sup>

Der erste Schritt in diesem Stoffwechselweg wird von einer NAD-abhängigen 4,6-Dehydratase LegB katalysiert, wobei als Startmaterial jedoch nicht wie in der Pseudaminsäure-Biosynthese UDP-GlcNAc, sondern GDP-GlcNAc dient. Das GDP-GlcNAc wird von LegB zu GDP-2-Acetamido-2,6-dideoxy- $\alpha$ -D-xyllo-hexos-4-ulose umgesetzt. Im folgenden Syntheseschritt wird dieses Intermediat mit Hilfe einer PLP-abhängigen Aminotransferase (LegC) an der C4-Position mit einer Aminofunktionalität versehen, welche direkt von einer N-Acetyltransferase (LegH) acetyliert wird, das daraus entstehende Intermediat ist GDP-2,4-Diacetamido-2,4,6-trideoxy- $\alpha$ -D-glucopyranose. Nun erst folgt der

Schritt der Epimerisierung an der C2-Position von *gluco*-Konfiguration in die benötigte *manno*-Konfiguration mittels eines Enzymes mit dualer Funktion (LegG, GDP-Hydrolase und C2-Epimerase). Die daraus entstehende Komponente ist ein 6-Deoxy-mannosederivat, das nun von der Legionminsäuresynthase (LegI) in der entsprechenden aldol-artigen Kondensationsreaktion mit PEP zur entsprechenden Legionaminsäure (Leg) umgesetzt wird.<sup>[16]</sup> Um diese Sialinsäuren (Neu5Ac, Pse und Leg) oder ihre Derivate an ihren endgültigen Bestimmungsort zu übertragen sind weitere enzymatische Schritte notwendig (Schema 1.5).<sup>[40-41]</sup> Der wichtigste hierbei ist die Nukleotid-Aktivierung der Sialinsäure (Schema 1.5 [a])<sup>[42-45]</sup>, um diese als Donorsubstrat auf einen entsprechenden Akzeptor zu übertragen (Schema 1.5 [b]).<sup>[46]</sup> Die Aktivierung der Sialinsäure wird zum Beispiel in *Neisseria meningitidis* von einer CMP-abhängigen Sialat-Synthetase katalysiert (CSS<sub>Nme</sub>, EC 2.7.7.43). Detaillierte Untersuchungen zur Substrattoleranz dieser CSS, Cofaktoroptimierung und inhibitorischen Effekten wurden in unserer Gruppe von *He* durchgeführt.<sup>[46]</sup>



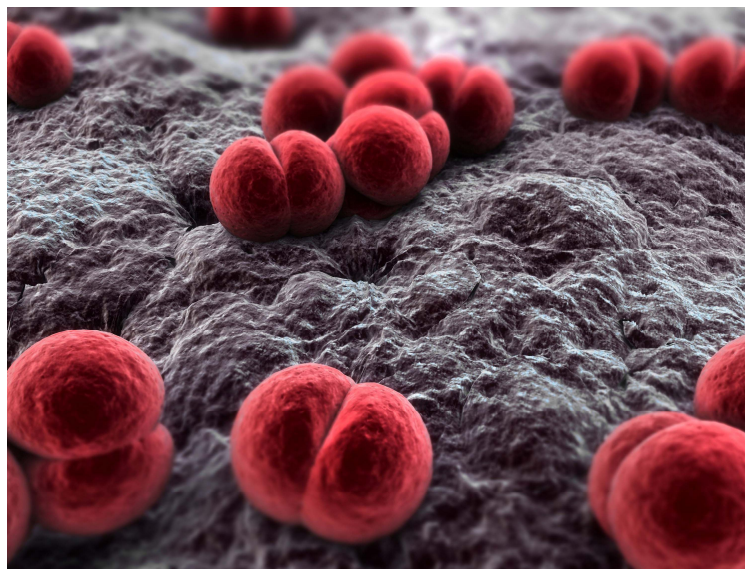
**Schema 1.5:** Beispiel für die Übertragung einer Sialinsäure **[a]** Aktivierung von Neu5Ac mittels CSS<sub>Nme</sub> **[b]** Sialyltransfer von CMP-Neu5Ac auf ein Akzeptormolekül GalNAc.

Im letzten Schritt dieser Enzymkaskade wird die CMP-aktivierte Sialinsäure bzw. das Sialinsäurederivat mittels einer Sialyltransferase (SiaT, EC 2.4.99.) α-selektiv, sowie regio- und stereospezifisch auf ein Akzeptormolekül übertragen<sup>[47]</sup> Die Art der Verknüpfung im entstehenden Sialokonjugat kann hier je nach Art der Sialyltransferase (α-2,3<sup>[48-49]</sup>, α-2,6<sup>[48]</sup>, α-2,8<sup>[49]</sup>, α-2,9<sup>[50-51]</sup>) unterschiedlich sein, auch erfolgt der Transfer auf unterschiedliche Akzeptormolekül, wie zum Beispiel terminale GalNAc-, GlcNAc- oder Galactosereste.<sup>[47]</sup>



### 1.3 Die PEP-abhängige Synthese aus *Neisseria meningitidis*

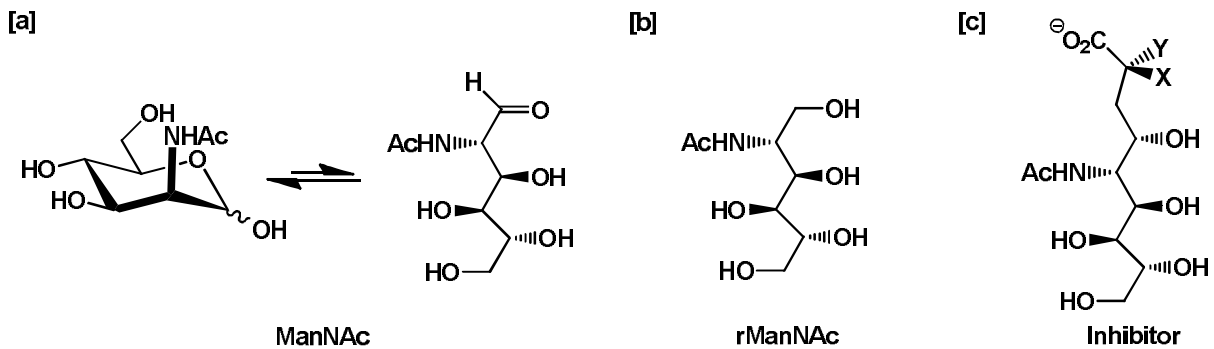
Obwohl Sialinäuren eine große strukturelle Diversität aufweisen, beschränkt sich ihr Vorkommen doch ausschließlich auf Säuger, Wirbeltiere und einige pathogene und nicht-pathogene Mikroorganismen<sup>[1-2, 4]</sup>. Einer dieser pathogenen Mikroorganismen ist das Gram-negative Bakterium *Neisseria meningitidis*, einer der häufigsten Erreger der eitrigen Hirnhautentzündung weltweit (Abbildung 1.5).<sup>[52]</sup>



**Abbildung 1.5:** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von *Neisseria meningitidis* Serogroup B.<sup>[53]</sup>

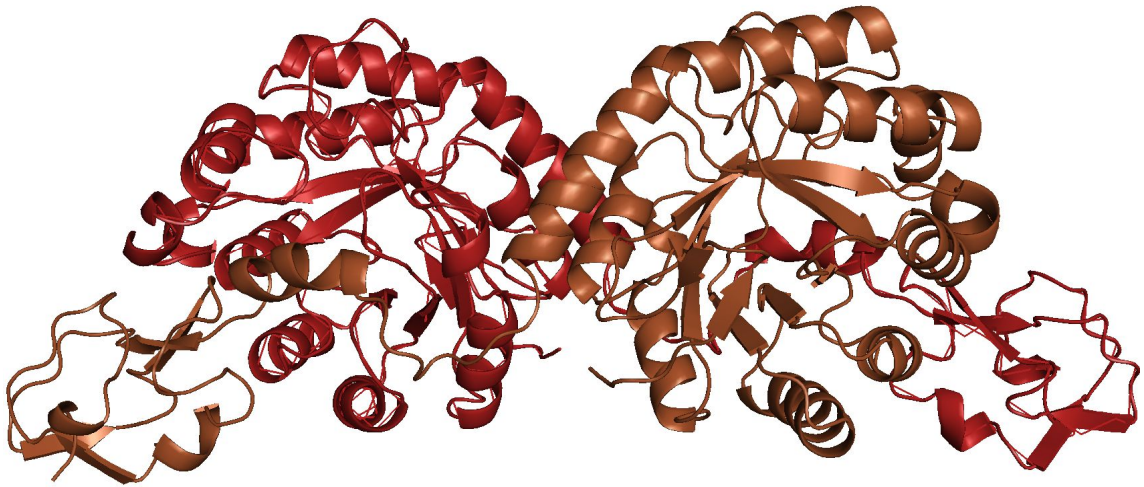
Pathogene Mikroorganismen wie *Neisseria meningitidis* oder bestimmte Typen von *Escherichia coli* produzieren hochsialylierte Kapselpolysaccharide auf ihrer Zelloberfläche mit Polysialinsäureeinheiten (PSA). Diese strukturelle Einheit nutzen diese Pathogene als Tarnung (molekulare Imitation menschlicher Zelloberflächen)<sup>[52]</sup>, um einem Angriff des menschlichen Immunsystems entgehen zu können<sup>[54]</sup> was den Fokus der Forschung auf ein besseres Verständnis über die Struktur der Sialinsäure-Synthasen und vor allem den Ablauf der katalytischen Reaktion richtet. Detaillierte Untersuchungen hierzu wurden, vor allem mit der *N*-Acetylneuraminsäure-Synthase aus *Neisseria meningitidis* (Neu<sub>Nme</sub>) durchgeführt. Die Struktur der NeuS<sub>Nme</sub> konnte inzwischen aufgeklärt werden.<sup>[30, 55]</sup> Die Gruppe um Wakarchuck<sup>[30]</sup> untersuchte 2005 die Kristallstruktur von NeuS<sub>Nme</sub> (PDB-Code 1XUZ) in Gegenwart von Mn<sup>2+</sup>, PEP und *N*-Acetylmannosaminitol (rManNAc) einer reduzierten Form des natürlichen Substrates ManNAc. 2009 untersuchte die Gruppe um Tanner<sup>[55]</sup> eine

ähnliche Kristallstruktur von NeuS<sub>Nme</sub> (PDB-Code 2WQP) nur mit einem  $sp^3$ -hybridisierten Analogon eines postulierten Reaktionsintermediats<sup>[55]</sup> anstelle eines reduzierten Substrates als Inhibitor in der *active-site* gebunden (Abbildung 1.6). Die Untersuchungen der Kristallstruktur zeigten, dass es sich bei NeuS<sub>Nme</sub> um ein „Domänen-vertauschtes“ Homodimer handelt mit einer Masse von 38,63 kDa (Abbildung 1.7).

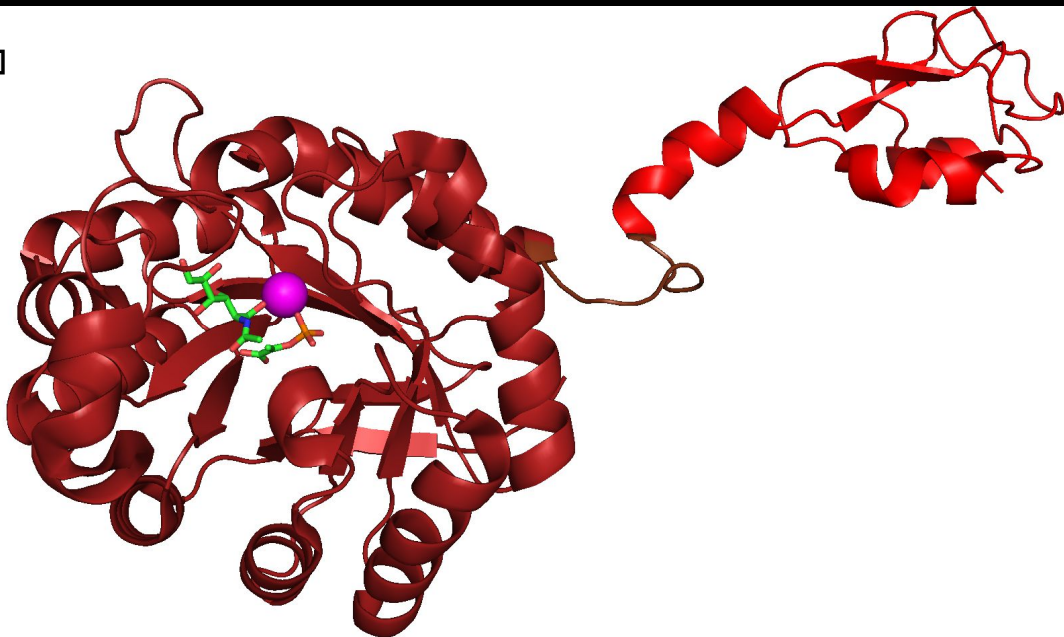


**Abbildung 1.6:** Für kristallographische Studien mit der NeuS<sub>Nme</sub> eingesetzte Substrate [a] das natürliche Substrat ManNAc [b] *N*-Acetylmannosaminitol<sup>[30]</sup> [c] Inhibitor (X=OPO<sub>3</sub><sup>-</sup>, Y=H bzw. X=H, Y=OPO<sub>3</sub><sup>-</sup>).<sup>[55]</sup>

[a]



[b]

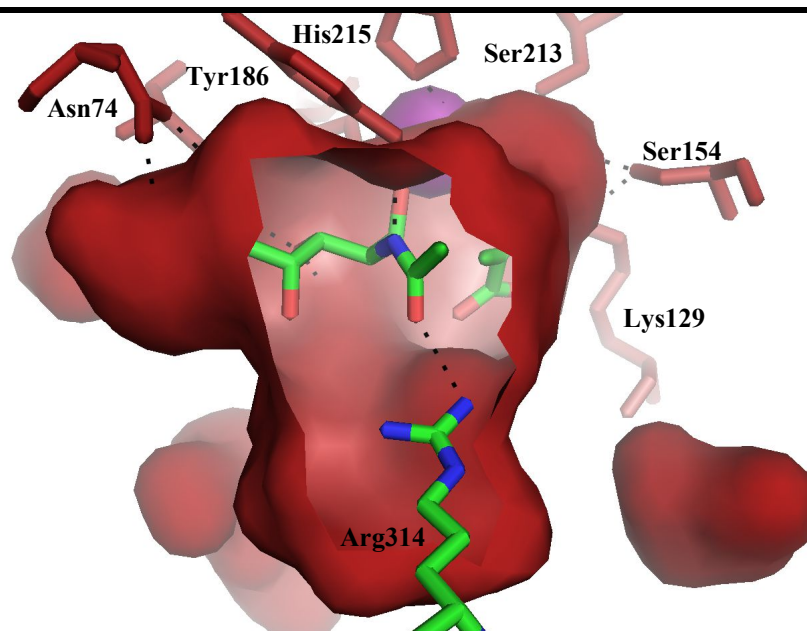
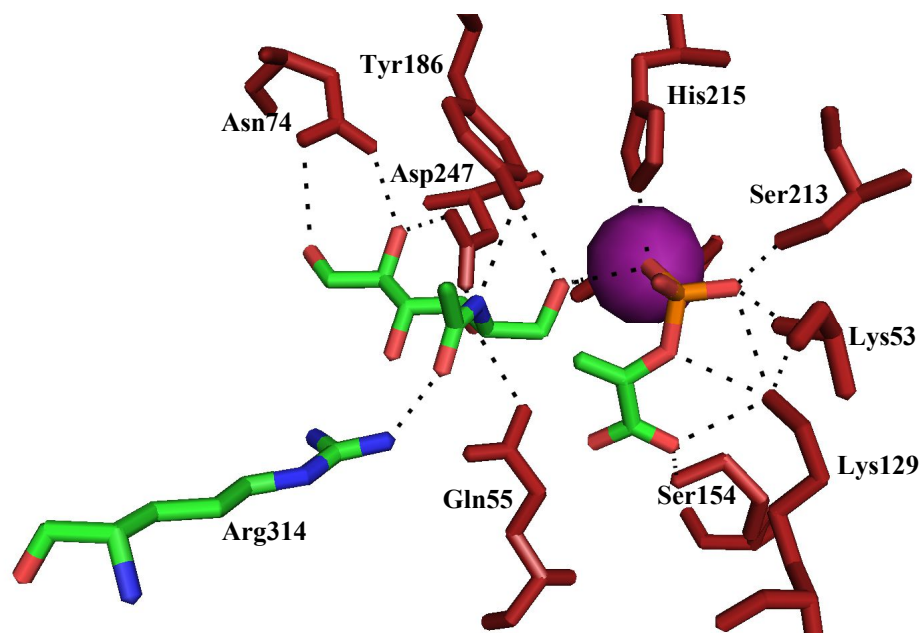


**Abbildung 1.7:** Kristallstruktur der *N*-Acetylneuraminsäuresynthase NeuS<sub>Nme</sub> (PDB-Code 1XUZ). [a] als Homodimer und [b] als Monomer mit den Substraten in der *active-site*.<sup>[56]</sup> Die Substrate rManNAc und PEP sind in grün und das zweiwertige Mangan in violett dargestellt.

---

Die beiden Untereinheiten mit insgesamt 369 Aminosäuren bestehen aus zwei strukturell identischen Domänen, die jeweils durch einen Linker miteinander verbunden sind. Die *N*-terminale Domäne der NeuS<sub>Nme</sub>, welche die Aminosäuren 1-273 umfasst, besteht aus einem gefalteten ( $\alpha/\beta$ )<sub>8</sub>-Fass. Die Faltung entspricht der eines typischen TIM-Barrels, mit einem äußeren Loop, bestehend aus den Resten 61-87.<sup>[30]</sup> Am C-terminalen Ende dieser TIM-barrel-ähnlichen Domäne befindet sich eine Vertiefung, welche die *active-site* mit fast allen katalytisch aktiven Aminosäureresten enthält.

Die *C*-terminale Domäne der NeuS<sub>Nme</sub> umfasst 65 Aminosäurereste, welche über einen Linker mit der *N*-terminalen TIM-Domäne verbunden ist, diese bilden in ihrem Faltungsmuster ein für PEP-abhängige Synthasen völlig neues Motiv.<sup>[56]</sup> Die Aminosäuren 285-349 bilden eine antifreeze protein-artige Domäne, diese ähnelt einer Vielzahl von Typ III AFPs.<sup>[56-57]</sup> Diese *C*-terminale Domäne bedeckt den Eingang zum katalytischen Zentrum des gegenüber liegenden Monomers (Abbildung 1.8).<sup>[56]</sup>



**Abbildung 1.8:** An der katalytischen Reaktion in der *active-site* von NeuS<sub>Nme</sub> beteiligte Aminosäurereste, sowie die für die katalytische Aktivität essentielle Aminosäure Arg 314 aus der AFP-III-ähnlichen Domäne der gegenüberliegenden Untereinheit des Homodimers NeuS<sub>Nme</sub>.

Die Domäne dient zum einen dazu, die katalytische Reaktion vor äußeren Einflüssen durch Lösungsmittelmoleküle zu schützen, zum anderen enthält diese Domäne einen in bakteriellen Sialinsäuresynthasen hochkonservierten Aminosäurerest Arg314.<sup>[56]</sup> Dieses Arg314 stellt eine der Schlüsselaminosäuren in der katalytischen Reaktion dar. Es ist in der Domäne so positioniert, dass seine delokalisierte positiv geladene Guanidiniumfunktionalität in die *active-site* reicht, dort über Wasserstoffbrückenbindung mit dem Carbonyl-Sauerstoffatom der

---

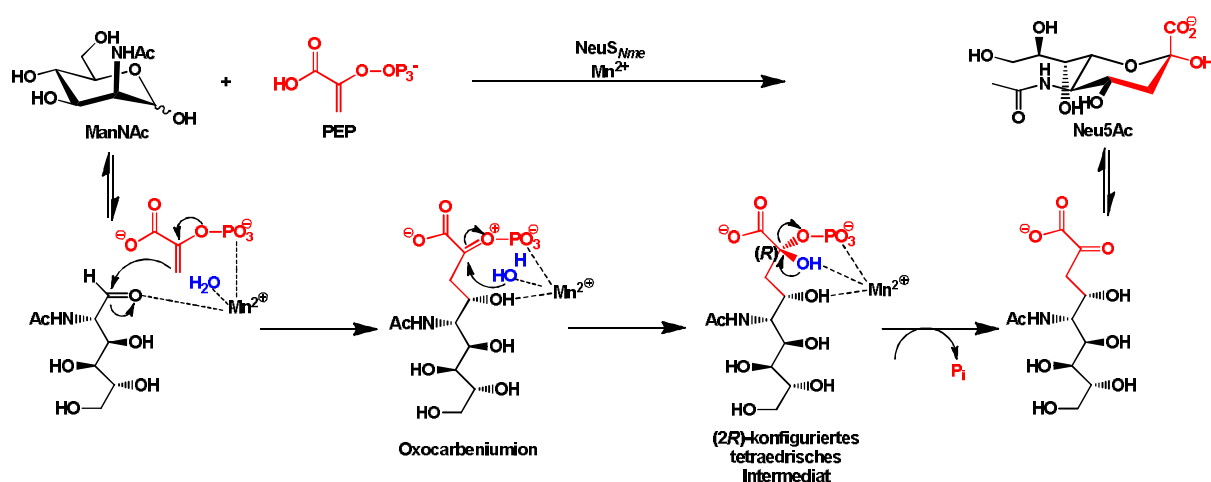
*N*-Acetylgruppe im rManNAc wechselwirkt und mit für eine passende Ausrichtung des reduzierten als auch des natürlichen Substrates ManNAc für die Reaktion mit PEP sorgt. Experimente mit Mutationen an Position 314 haben gezeigt, dass ein Austausch des Arginins gegen Lysin (R314K) oder gegen Alanin (R314A) große Auswirkungen auf die katalytische Aktivität von NeuS<sub>Nme</sub> haben.<sup>[56]</sup> Die R314K Mutante zeigte eine deutlich abgeschwächte Aktivität, während bei der R314A Mutanten keine Aktivität mehr vorhanden war.

Hierzu wurden die entsprechenden Mutanten generiert, ebenfalls kristallisiert und mit der Kristallstruktur des Wildtyps NeuS<sub>Nme</sub> mit dem reduzierten Substrat rManNAc verglichen, sowie am Computer das natürliche Substrat ManNAc in die Mutanten und den Wildtyp modelliert.<sup>[30, 56]</sup> Beim Vergleich der gesamten Proteinstruktur, Faltung der Mutanten und ihrer Geometrie der *active-site* zum Wildtyp konnten keine signifikanten Änderungen in der Konformation festgestellt werden. Die Hydroxygruppe an C1-Position in rManNAc, die der Aldehydgruppe im offenkettigen ManNAc entspricht, wird über Wasserstoffbrückenbildung zu den Seitenketten von Tyr-186, His-236 und einem in der *active-site* befindlichen Wassermolekül in der korrekten Position für die Reaktion gehalten. Die weiteren Hydroxygruppen der Zuckerkette bilden Wasserstoffbrücken mit den Seitenketten der Aminosäuren Asp-247, Gln-55 und Asn-74 und einem Wassermolekül aus. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Guanidiniumfunktionalität in der Seitenkette nicht zwingend erforderlich ist für die korrekte Platzierung der *N*-Acetyl- und der Aldehydgruppe des natürlichen Substrates ManNAc in der *active-site*, dies geschieht über Wasserstoffbrückenbildung mit der Acetylgruppe und elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen dem Guanidiniumrest und dem partiell negativ geladenen Carbonylsauerstoffatom. Die Seitenkette des Lysinrestes kann ebenfalls noch durch elektrostatische Wechselwirkungen mit dem Carbonylsauerstoffatom stabilisierend agieren.<sup>[56]</sup> Mit Verlust dieser stabilisierenden Wechselwirkung geht auch die Aktivität des Enzyms verloren.

Neben dem Zuckerderivat und Phosphoenolpyruvat als Substrate benötigen die bakteriellen Sialinsäure-Synthasen noch ein zweiwertiges Metallion, wie Co<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup> oder Mg<sup>2+</sup> als essentiellen Cofaktor, zum einen zur Stabilisierung ihrer Struktur, zum anderen für ihre katalytische Aktivität.<sup>[30]</sup> Für NeuS<sub>Nme</sub> ist Mn<sup>2+</sup> ein sehr guter Aktivator.<sup>[9, 30, 58]</sup> Andere Synthasen werden gut durch Co<sup>2+</sup><sup>[47]</sup> aktiviert. Das zweiwertige Mangan dient als elektrostatischer Katalysator zur Aktivierung der Aldehydgruppe des ManNAc.<sup>[56]</sup> In der *active-site* wird das Manganion oktaedrisch koordiniert, als equatoriale Liganden dienen die Aminosäurereste His-215, His-216, die Phosphatgruppe von PEP und ein Wassermolekül. Die axialen Liganden in der oktaedrischen Koordination sind die Hydroxygruppe an C1-Position



in rManNAc und ein Wassermolekül.<sup>[55]</sup> Die Carboxylat- und die Phosphatgruppe von PEP bilden in der *active-site* einige Wasserstoffbrücken mit konservierten Aminosäureresten aus, vor allem mit Serinresten (Ser-132, Ser-154 und Ser-213) und Asn-184.<sup>[30]</sup> Elektrostatische Wechselwirkungen bestehen zwischen der Carboxylatgruppe und den Seitenketten von Lys-129 und Lys-53. Durch ihre Lokalisierung im Inneren der Vertiefung haben die beiden vinylischen Kohlenstoffatome des Phosphoenolpyruvates (PEP) mit keinen Aminosäureresten Interaktionen. Die katalysierte Reaktion verläuft über mehrere Schritte unter Ausbildung eines Oxocarbeniumionintermediats und einem (2*R*)-konfigurierten tetraedrischen Intermediat (Schema 1.6).<sup>[55]</sup> Das Manganion spielt hierbei eine duale Rolle, zum einen als elektrostatischer Katalysator zur Aktivierung der Aldehydgruppe in ManNAc, sowie als Quelle für ein aktiviertes Wassermolekül.

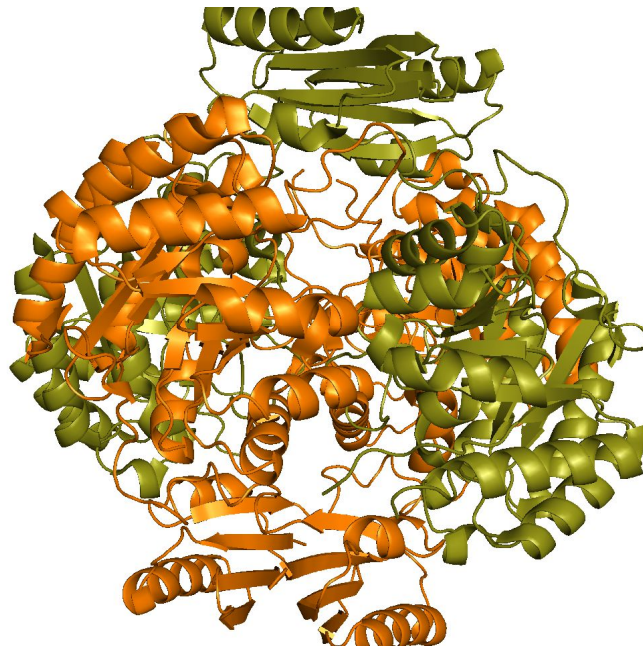


**Schema 1.6:** Mechanistische Details der von NeuS<sub>Nme</sub> katalysierten Reaktion.<sup>[30]</sup>

Zunächst erfolgt ein *si*-Seitenangriff des terminalen vinylischen C3-Atoms des Phosphoenolpyruvates (PEP) auf die *re*-Seite des Carbonyl-C1-Atoms des *N*-Acetylmannosamins (ManNAc). Durch diesen Angriff entsteht das Oxocarbeniumion, welches nun von einem aktivierten Wassermolekül nucleophil angegriffen wird und dabei das tetraedrische Intermediat ausbildet. Abschließend entsteht unter Abspaltung des Phosphats die freie *N*-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac). Die kristallographischen Untersuchungen von NeuS<sub>Nme</sub> mit dem reduzierten Substrat rManNAc<sup>[30]</sup> (PDB-Code 1XUZ) und dem als Inhibitor eingesetzten tetraedrischen Substratanalogon<sup>[55]</sup> (PDB-Code 2WQP) zeigten, dass das zweiwertige Metallion eine wichtige Rolle auch im Ablauf der katalytischen Reaktion spielt. Dies unterscheidet die *N*-Acetylneuraminsäure-Synthase aus *Neisseria meningitidis* (NeuS<sub>Nme</sub>) von der 2-Keto-3-deoxy-D-*manno*-8-phosphooctosonat-Synthase (KDO8PS, EC 2.5.1.55), die ebenfalls zur Familie der PEP-abhängigen Synthasen gehört, und die man unter

---

anderem in *Neisseria meningitidis* Serogroup B (Abbildung 1.9)<sup>[59]</sup>, *Neisseria gonorrhoeae* und *Escherichia coli*<sup>[60]</sup> findet.

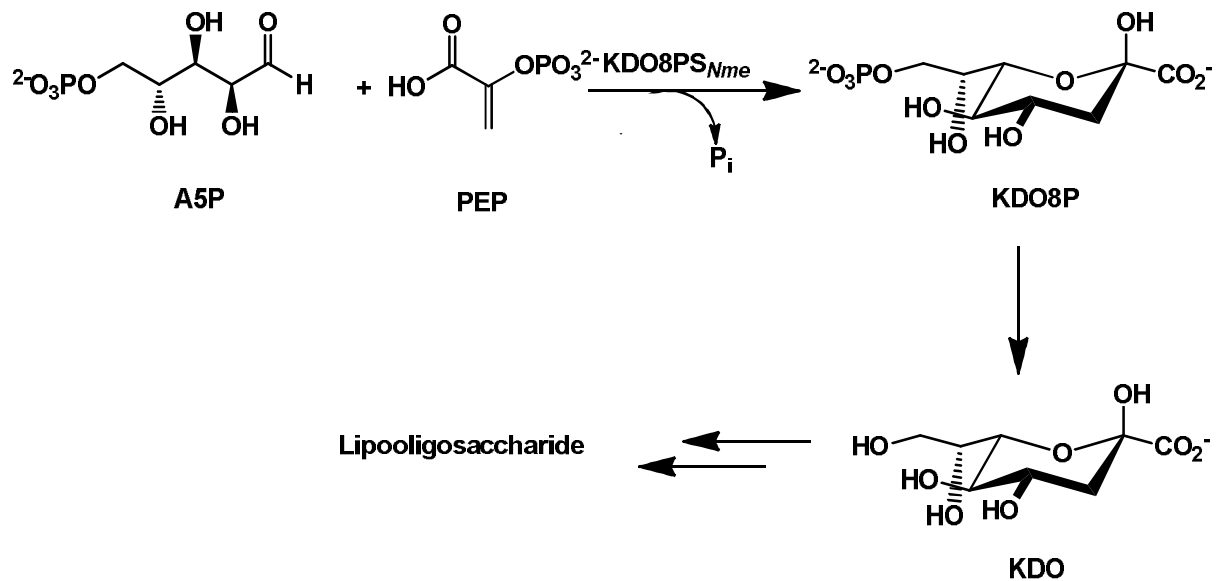


**Abbildung 1.9:** Kristallstruktur von KDO8PS aus *Neisseria meningitidis* Serogroup B (PDB-Code 2QKF) als Homotetramer und als monomere Untereinheit.

Das homotetramere Enzym KDO8PS katalysiert die Kondensationsreaktion von Phosphoenolpyruvat (PEP) und Arabinose-5-phosphat (A5P) zu 2-Keto-3-deoxy-D-manno-octosonsäure-8-phosphat (KDO8P). Dies stellt den vorletzten Schritt im Biosyntheseweg zu 2-Keto-3-deoxy-D-manno-octosonsäure (KDO) dar, welches



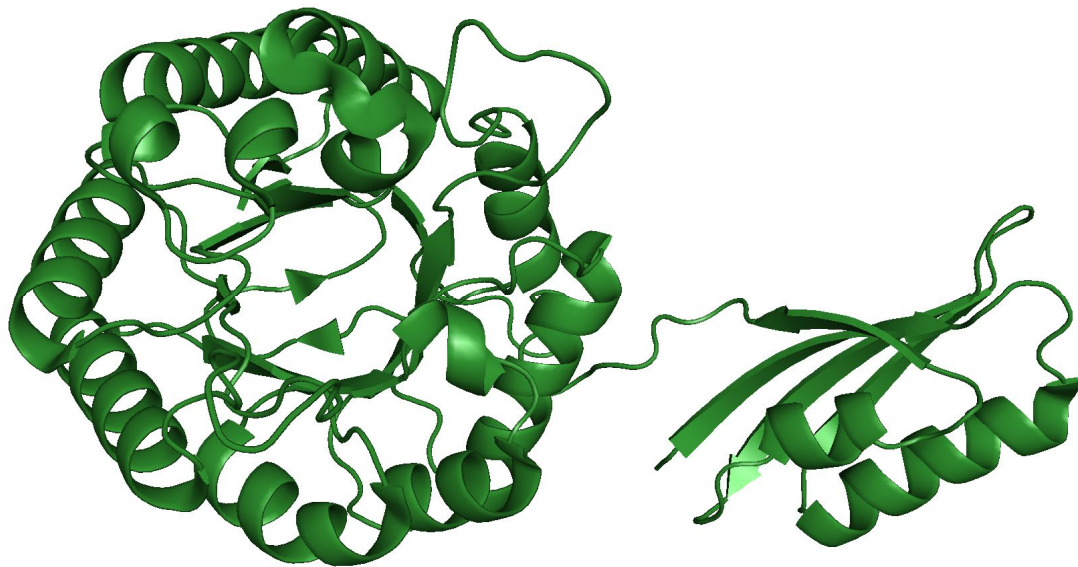
eine essentielle Komponenten der Lipooligosaccharide von Gram-negativen Bakterien ist (Schema 1.7).<sup>[60-61]</sup>



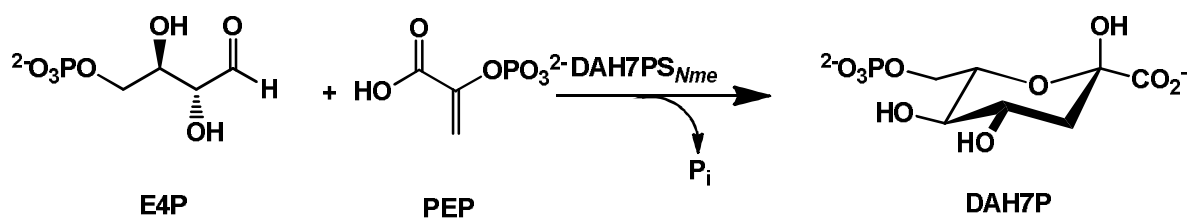
**Schema 1.7:** Von der KDO8PS<sub>Nme</sub> katalysierte Kondensationreaktion zwischen Arabinose-5-phosphat (A5P) und PEP zu 2-Keto-3-deoxy-D-manno-octosonsäure-8-phosphat (KDO8P) dem Auftaktschritt im Biosyntheseweg zu 2-Keto-3-deoxy-D-manno-octosonsäure (KDO).

Die KDO8P-Synthase ist im Gegensatz zur NeuS<sub>Nme</sub> nicht zwingend auf die Anwesenheit eines zweiwertigen Metallions für die katalytische Aktivität angewiesen, was durch Mutationsexperimente gezeigt wurde.<sup>[62-63]</sup> In einigen pathogenen Organismen finden sich auch metall-unabhängige KDO8P-Synthasen.<sup>[64]</sup>

Dagegen ist die der KDO8P-Synthase strukturell-ähnliche phenylalanin-sensitive 2-Keto-3-deoxy-D-arabino-7-phosphoheptosonat-Synthase (DAH7PS, EC 2.5.1.54)<sup>[65-67]</sup> (Abbildung 1.10), ebenfalls auf ein zweiwertiges Metallion für die katalytische Aktivität angewiesen.<sup>[66]</sup> Die DAH7P-Synthase (PDB-Code 1RZM) katalysiert den ersten Schritt im Shikimatweg, dem Biosyntheseweg zu aromatischen Komponenten in Pflanzen und Mikroorganismen, durch Kondensation von Phosphoenolpyruvat (PEP) und Erythrose-4-phosphat (E4P) zu 3-Deoxy-heptulosonsäure-7-phosphat (DAH7P) (Schema 1.8).

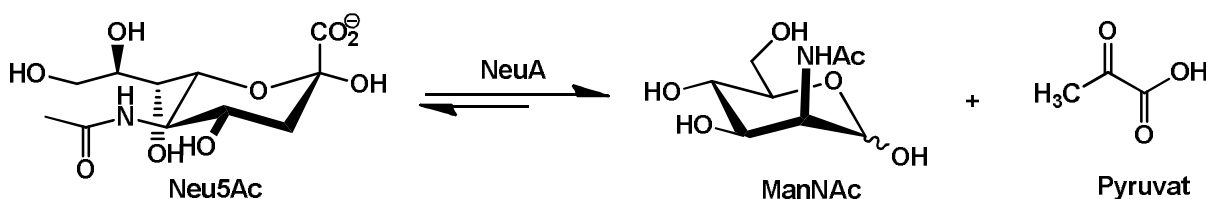


**Abbildung 1.10:** Kristallstruktur von DAH7PS aus *Neisseria meningitidis* Serogroup B (PDB-Code 1RZM) als Homotetramer und als monomere Untereinheit.



**Schema 1.8:** DAH7PS<sub>Nme</sub>-katalysierter Auftaktschritt im Shikimat-Biosyntheseweg, die Kondensationsreaktion zwischen Phosphoenolpyruvat (PEP) und Erythrose-4-phosphat (E4P) zu 3-Deoxy-heptulosonsäure-7-phosphat (DAH7P).

Für die präparative enzymatische Synthese von Sialinsäuren und deren Derivaten, vor allem von Neu5Ac und KDN<sup>[46]</sup> im Labormaßstab wurde bisher meist die *N*-Acetylneuraminsäure-Aldolase (NeuA, EC 4.1.3.3) als Enzym verwendet. Die NeuA findet sich in einigen Säugetieren, sowie in pathogenen und nicht-pathogenen Bakterien<sup>[46, 68]</sup>, wo sie eine reversible Aldolspaltungsreaktion von Neu5Ac zu ManNAc und Pyruvat (Schema 1.9) katalysiert.



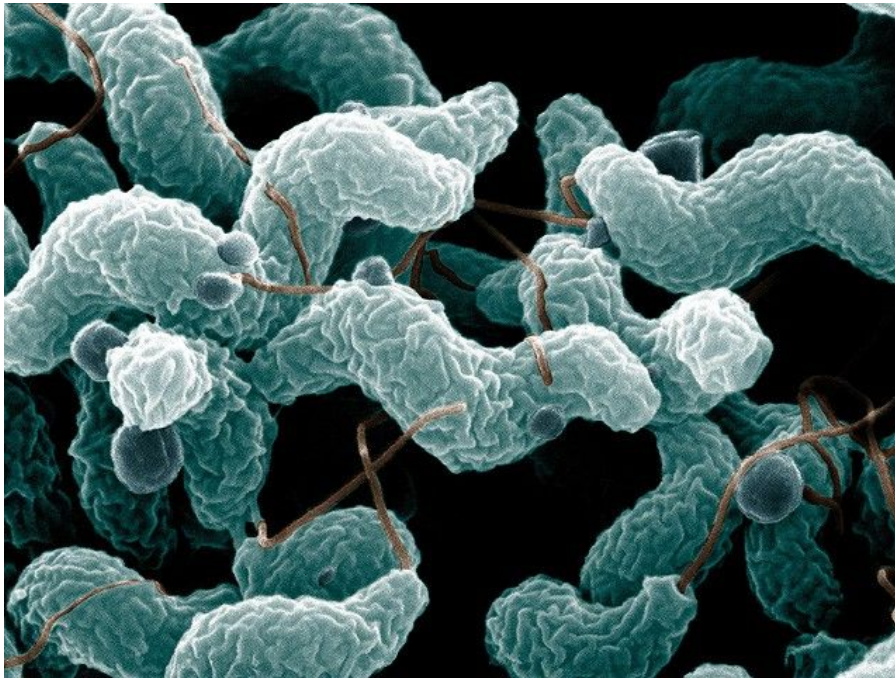
**Schema 1.9:** Reversible Adolspaltung katalysiert durch die *N*-Acetylneuramisäurealdolase (NeuA).

Um das Gleichgewicht dieser Reaktion auf die Seite der *N*-Acetylneuraminsäure zu verschieben, muss das Substrat Natriumpyruvat im Überschuss eingesetzt werden. Nähere Untersuchungen der NeuA zeigten, dass sie eine sehr große Substrattoleranz besitzt und diese sich nicht nur auf D-Zucker beschränkt, sondern auch Zucker in L-Konfiguration von der NeuA umgesetzt werden.<sup>[69-70]</sup> Nachteilig an der Verwendung dieser Lyase ist das im Überschuss eingesetzte Pyruvat, welches die Aufreinigungsschritte im Anschluß an die enzymatische Synthese stört.

Nachdem es Knorst in unserer Arbeitsgruppe erstmals gelang, durch Klonierung des Gens der *N*-Acetylneuraminsäure-Synthase aus *Neisseria meningitidis* Serogroup B in ein effektives Überexpressionssystem in *Eschericcia coli*, NeuS<sub>Nme</sub> in größerem Maßstab herzustellen, wurde diese von Knorst<sup>[69]</sup> und Unruh<sup>[70]</sup> erstmals erfolgreich für präparative Synthesen verwendet.

## 1.4 Die PEP-abhängigen Synthesen aus *Campylobacter jejuni*

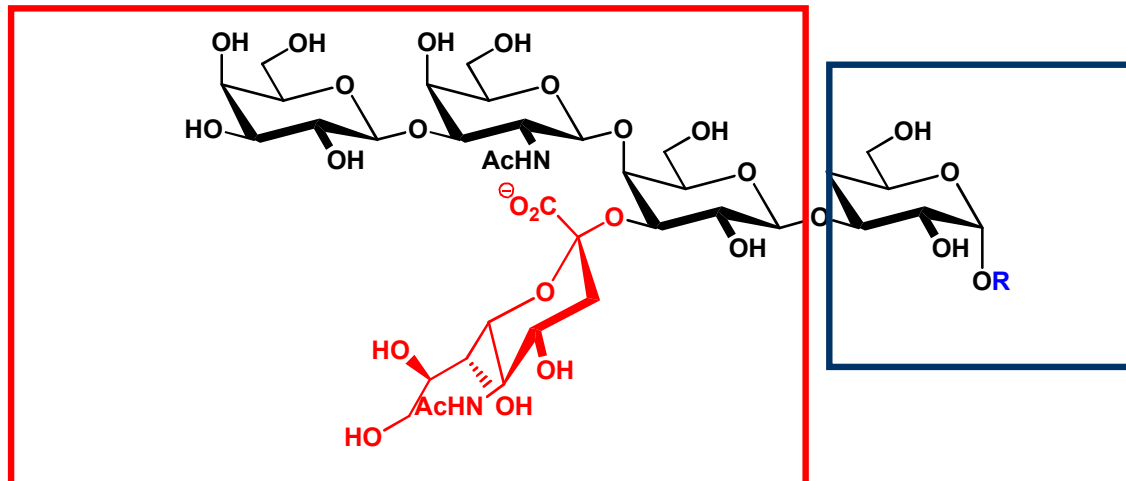
*Campylobacter jejuni* ist ein begeißeltes, frei bewegliches Gram-negatives humanpathogenes Bakterium, das einer der Haupterreger von akuter bakterieller Gastroenteritis und, neben *Campylobacter coli*, auch der Haupterreger für Diarrhoe ist (Abbildung 1.11).<sup>[71]</sup>



**Abbildung 1.11:** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von *Campylobacter jejuni*.<sup>[72]</sup> Das Flagellum ist in braun dargestellt.

Im Genom von *Campylobacter jejuni* wurde ein Gencluster identifiziert, welcher auch für drei PEP-abhängige Synthesen codiert.<sup>[10, 71, 73]</sup> Eines dieser drei korrespondierenden Enzyme ist ebenfalls eine *N*-Acetylneuraminsäure-Synthase (NeuS<sub>Cje</sub>; EC 2.5.1.56) welche ein sehr großes Maß an Sequenzidentität und Homologie zu den in *Neisseria meningitidis* serogroup 1 und *Escherichia coli* gefundenen Synthesen besitzt.<sup>[9, 14, 74]</sup>

Die Synthase NeuS<sub>Cje</sub> katalysiert einen Schritt in einer Enzymkaskade, die für die Sialylierung der auf der äußeren Zelloberfläche von *Campylobacter jejuni* lokalisierten Lipooligosaccharide (LOS) mit *N*-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac) als terminale/äußere Einheit verantwortlich ist. Diese Lipooligosaccharidstrukturen sind als einer der Virulenzfaktoren identifiziert worden<sup>[10-11, 71]</sup>, da sie menschliche Ganglioside imitieren<sup>[75]</sup>, wie man sie vor allem in großer Häufigkeit auf der Oberfläche von Nervenzellen im peripheren Nervensystem findet (Abbildung 1.12).



**R:** - $\alpha(1,4)$ -Hep- $\alpha(1,3)$ -Hep- $\alpha(1,5)$ -KDO-Lipid A

**Abbildung 1.12:** Struktur des GM1-artigen Lipooligosaccharides (LOS) aus *Campylobacter jejuni*. Das Epitop des LOS, mit der identischen Struktur des Gangliosids GM1, ist **rot**, der Linker und der Anker zwischen Epitop und Zelloberfläche sind **blau** umrandet.

Das Epitop des GM1-artigen Lipooligosaccharides aus *Campylobacter jejuni* ist strukturell-identisch dem humanen Gangliosid GM1 und über einen kurzen Linker, bestehend aus einem Trisaccharid der Struktur  $\alpha(1,4)$ -Hep- $\alpha(1,3)$ -Hep- $\alpha(1,5)$ -KDO, mit dem Membrananker Lipid A verbunden.<sup>[76]</sup> Dieses sogenannte „molekulare Mimicry“ kann im Falle einer Infektion zu neurologischen Folgeerkrankungen führen durch die resultierende Kreuzreaktion des Immunsystems, da diese keine Unterscheidungsmöglichkeit zwischen den körpereigenen Zellen und Fremdzellen hat.<sup>[75]</sup> Bekannt sind unter anderem das Guillian-Barré-<sup>[77-78]</sup> oder das Miller-Fischer-Syndrom.<sup>[79]</sup>

Die Funktion des zweiten Enzyms, in der Literatur als NeuB2 gelistet, ist noch nicht aufgeklärt. Vieles deutet daraufhin, dass es ebenfalls an der Modifikation des Flagellum beteiligt ist.<sup>[73]</sup> Das für die Beweglichkeit von *Campylobacter jejuni* verantwortliche polare Flagellum ist ein weiterer Virulenzfaktor und für das Bakterium absolut notwendig für die Kolonisierung des Gastro-Intestinal-Traktes. Die Oberfläche des Flagellum ist stark glycosyliert mit Pseudaminsäureresten (Pse), welche für die korrekte Ausbildung des Flagellums notwendig und in die Beweglichkeit sowie die Invasion von Wirtszellen involviert sind.<sup>[10]</sup> Für die Sialylierung des Flagellums ist ebenfalls das dritte Enzym aus diesem Cluster verantwortlich. Hierbei handelt es sich um eine PEP-abhängige Pseudaminsäuresynthase

---

(PseS<sub>Cje</sub>).<sup>[80]</sup> Die Pseudaminsäuresynthase PseS<sub>Cje</sub> zeigt 35% Identität zu der entsprechenden *N*-Acetylneuraminsäuresynthase NeuS<sub>Nme</sub> in *Neisseria meningitidis*.<sup>[80]</sup> Auch diese Synthase gehört zur gleichen Klasse wie die beiden PEP-abhängigen *N*-Acetylneuraminsäuresynthasen NeuS<sub>Nme</sub> und NeuS<sub>Cje</sub>. In der von PseS<sub>Cje</sub> katalysierten Reaktion ist neben Phosphoenolpyruvat das zweite natürliche Substrat ein komplexerer Zucker auf der Basis von Altrose.



---

## 2 Zielsetzung

---

Für die Entwicklung neuer wirksamer Pharmazeutika gegen humanpathogene Mikroorganismen wie *Neisseria meningitidis* oder *Campylobacter jejunii*, bieten Sialokonjugate interessante neuartige Perspektiven.

Um einen Zugang zu derartigen Sialokonjugaten für detaillierte Studien zu bekommen, bieten sich verschiedene Optionen an. Neben dem sehr aufwendigen und schwierigen Weg über die chemische Synthese rückt die enzymatische Synthese in den engeren Fokus. An der Biosynthese dieser Sialokonjugate, mit externen oder internen Sialinsäureresten, sind in den pathogenen Mikroorganismen *Neisseria meningitidis* oder *Campylobacter jejunii* eine Vielzahl von unterschiedlichen Enzymen beteiligt.<sup>[9, 47, 81]</sup> Früherer Arbeiten in unserer Arbeitsgruppe hatten schon wichtige Enzyme detaillierter untersucht, die an diesem Biosyntheseweg beteiligt sind. He<sup>[46]</sup> untersuchte im Rahmen ihrer Arbeit die CMP-Sialyl-Synthase aus *Neisseria meningitidis* (CSS<sub>Nme</sub>). Dieses Enzym katalysiert die Aktivierung von Neu5Ac zur CMP-*N*-Acetylneuraminsäure (CMP-Neu5Ac). Die so aktivierte Neuraminsäure wird im letzten Schritt als Donorsubstrat auf die entsprechende Zielstruktur übertragen. Yi<sup>[82]</sup> beschäftigte sich unter anderem in seiner Arbeit mit der Untersuchung der an dieser Transferreaktion beteiligten Sialyltransferase.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten nun die in *Campylobacter jejuni* an der Biosynthese der Sialinsäure involvierten Sialinsäuresynthasen, spezifisch die *N*-Acetylneuraminsäuresynthase NeuS<sub>Cje</sub>, die Pseudaminsäuresynthase PseS<sub>Cje</sub> sowie das funktionell noch unbekannte NeuB2-Protein näher untersucht werden. Diese Enzyme waren bisher noch nicht tiefer gehend untersucht worden. Nur sehr wenige Gruppen weltweit haben sich bisher mit kinetischen Untersuchungen oder präparativen Synthesen mit diesen Sialinsäuresynthasen beschäftigt.<sup>[30, 58, 80]</sup> Die Enzyme bieten jedoch eine Alternative zur gängigen enzymatischen Synthese von Sialinsäuren mit der *N*-Acetylneuraminsäure-Aldolase (NeuA). Im Gegensatz zur NeuA mit einer ungünstigen Gleichgewichtslage zugunsten der

Edukte ist die von der NeuS<sub>Cje</sub> und der PseS<sub>Cje</sub> katalysierte Reaktion keine Gleichgewichtsreaktion. Um eine bessere Aussage über die Qualität der Substrate für die Synthese neuartiger, interessanter Sialinsäurederivate treffen zu können, sollten die Synthasen auch kinetisch untersucht werden. Im Zuge dieser kinetischen Untersuchungen sollte ein gekoppelter, kontinuierlicher High-Throughput-Assay, auf der Basis des von Knorst<sup>[69]</sup> in unserer Gruppe entwickelten „Recycling-Assay“, weiter entwickelt werden. Dieser Assay soll eine schnelle und effektive Untersuchung der Synthasen mit reproduzierbaren Ergebnissen möglich machen. Die für Kinetikstudien mit diesen Synthasen bisher verwendeten Assays (TBA-Assay<sup>[58]</sup> oder der Phosphat-Assay<sup>[55]</sup>) waren alle diskontinuierlich und mit einer hohen Fehleranfälligkeit belegt. Auch sind die mit diesen Assays erreichbaren Nachweisgrenzen zu hoch, um damit in Kinetikstudien „initial-rate“ Messungen in sehr geringen Konzentrationsbereichen durchzuführen. Der verwendete Expressionsklon für NeuS<sub>Nme</sub> wurde von Knorst und die, im Rahmen dieser Arbeit benötigten, neuen Expressionsklone für NeuS<sub>Cje</sub> und PseS<sub>Cje</sub> wurden in unserem Arbeitskreis von Kickstein konstruiert. Durch die Entwicklung und Etablierung solcher kontinuierlicher, gekoppelter Enzym-Assays für die Sialinsäuresynthasen sollte auch die tolerierte Substratbreite der Enzyme untersucht werden. Bei den Synthasen NeuS<sub>Nme</sub> und NeuS<sub>Cje</sub> sollte ausgehend vom natürlichen Substrat *N*-Acetylmannosamin schrittweise die strukturelle und elektronische Grundstruktur verändert werden. Hierfür kamen Änderungen in der *N*-Acetylgruppe sowie strukturelle und konfigurative Änderungen im Zuckergrundgerüst in Frage. Für die Pseudaminsäuresynthase PseS<sub>Cje</sub> war ein gleiches Vorgehen geplant. Auf Grund der Nichtverfügbarkeit des natürlichen Substrates der PseS<sub>Cje</sub> sollten für diese Kinetikstudien alternative Substratanaloga gesucht werden, wobei Galactosaminderivate konfigurative dem natürlichen Substrat am nächsten kommen. Der größte Teil dieser Substratpalette sollte im Rahmen dieser Arbeit synthetisiert werden, soweit sie nicht kommerziell erworben werden konnten. Zur Untermauerung der in den Kinetikstudien erhaltenen Ergebnisse sollten die Synthasen noch in präparativen/semi-präparativen Synthesen mit den Substraten eingesetzt werden. Abschließend erschien es reizvoll, die Ergebnisse anhand von Strukturmodellen der Proteine vergleichend zu interpretieren. Die Strukturen der Synthasen aus *Campylobacter jejuni* waren noch nicht röntgenkristallographisch aufgeklärt worden, jedoch kam als Referenz die experimentelle Struktur der *N*-Acetylneuraminsäuresynthase aus *Neisseria meningitidis* NeuS<sub>Nme</sub> in Frage.



## 3 Ergebnisse

### 3.1 Präparative Synthesen

#### 3.1.1 Synthese von *N*-modifizierten Aminosukzern

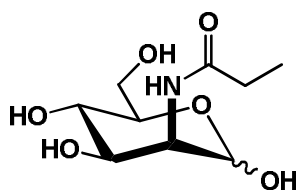
Für die Etablierung eines miniaturisierbaren High-Throughput-Assays für kinetische Studien der beiden *N*-Acetylneuraminsäuresynthasen aus *Neisseria meningitidis* (NeuS<sub>Nme</sub>) und *Campylobacter jejuni* (NeuS<sub>Cje</sub>) sowie der Pseudaminsäuresynthase aus *Campylobacter jejuni* (PseS<sub>Cje</sub>) wurde zunächst eine breite Substratpalette bestehend aus kommerziell erhältlichen Aldosen als auch aus selbst synthetisierten Aldosederivaten zusammengestellt (Tab. 3.1). Die Auswahl an Aldosen umfasste C5-, C6-, Amino- und Deoxyzucker mit Variationen in der *manno*-, *gluco*- und *galacto*-Konfiguration.

**Tabelle 3.1:** Übersicht aller im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Zucker. Die Aminzuckerderivate **2-22** wurden über meist einstufige Routen aus den entsprechenden freien Aminosukzern synthetisiert. Die Zucker **33-45** waren käuflich erworben.

Name	Struktur	Name	Struktur
<i>N</i> -Acetyl-D-mannosamin <b>2</b>		<i>N</i> -Methoxycarbonyl-D-galactosamin <b>20</b>	
<i>N</i> -Formyl-D-mannosamin <b>3</b>		<i>N</i> -Formyl-D-galactosamin <b>21</b>	

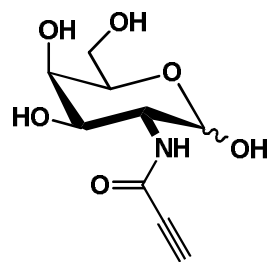
*N*-Propanoyl-D-mannosamin

4



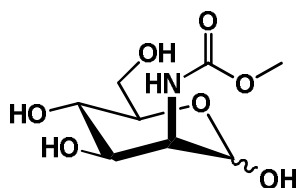
*N*-Propinoyl-D-galactosamin

22



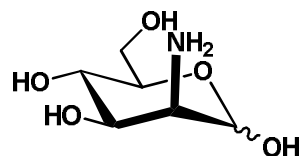
*N*-Methoxycarbonyl-D-mannosamin

5



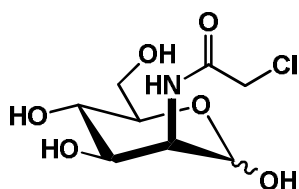
D-Mannosamin

33



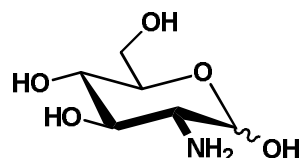
*N*-Chloroacetyl-D-mannosamin

6



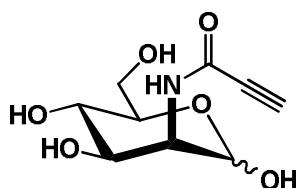
D-Glucosamin

34



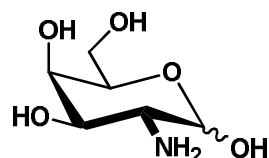
*N*-Propinoyl-D-mannosamin

7



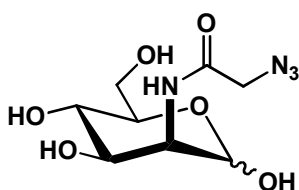
D-Galactosamin

35



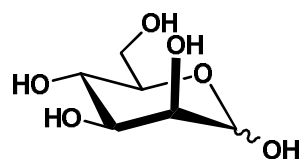
*N*-Azidoacetyl-D-mannosamin

8



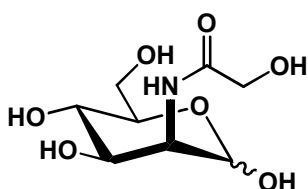
D-Mannose

36



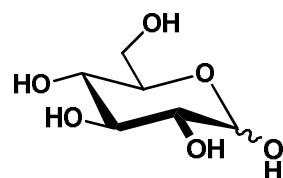
*N*-Glykolyl-D-mannosamin

9



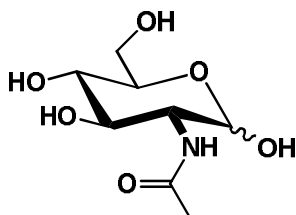
D-Glucose

37



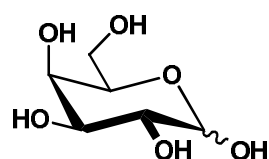
*N*-Acetyl-D-glucosamin

10

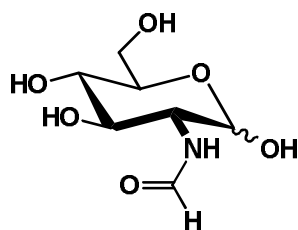


D-Galactose

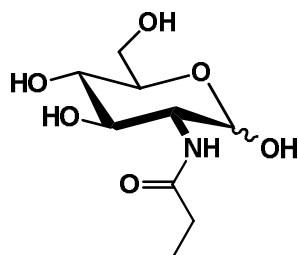
38



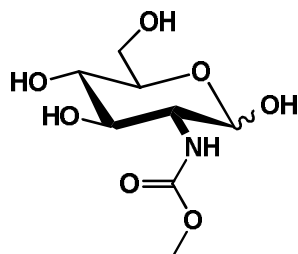
*N*-Formyl-D-glucosamin  
11



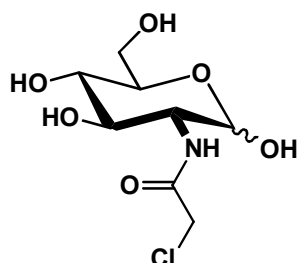
*N*-Propanoyl-D-glucosamin  
12



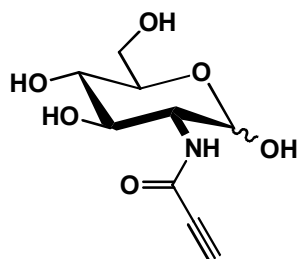
*N*-Methoxycarbonyl-D-glucosamin  
13



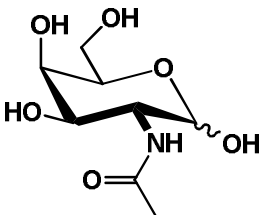
*N*-Chloroacetyl-D-glucosamin  
15



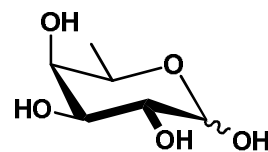
*N*-Propinoyl-D-glucosamin  
16



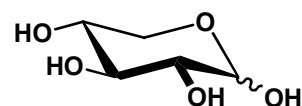
*N*-Acetyl-D-galactosamin  
18



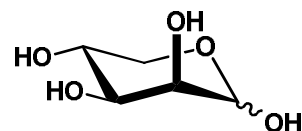
D-Fucose  
39



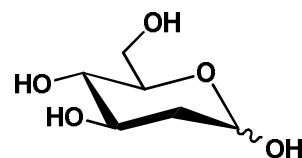
D-Xylose  
40



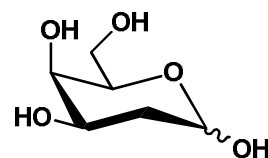
D-Lyxose  
41



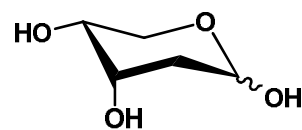
2-Deoxy-D-glucose  
42



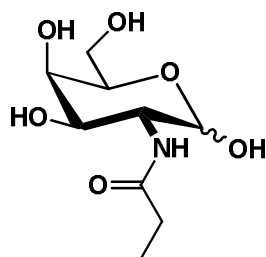
2-Deoxy-D-galactose  
43



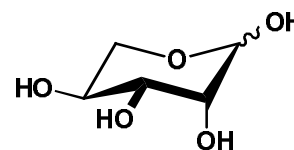
2-Deoxy-D-Ribose  
44



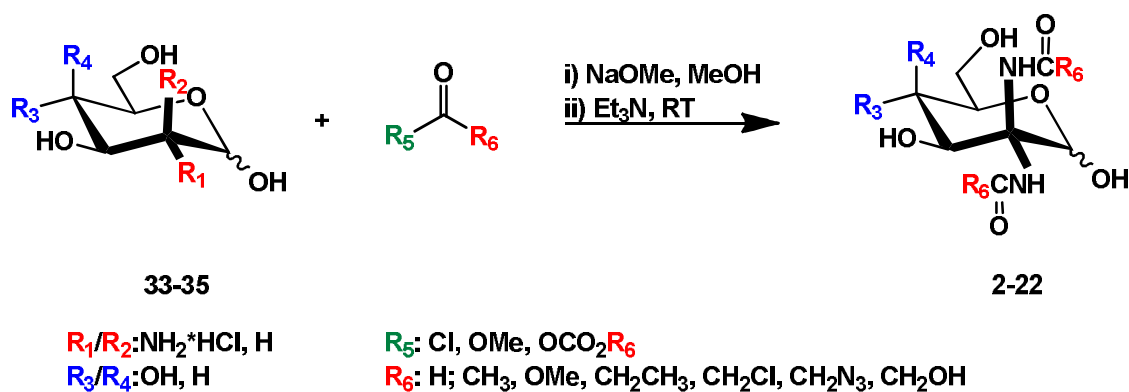
*N*-Propanoyl-D-  
galactosamin  
19



L-Lyxose  
45



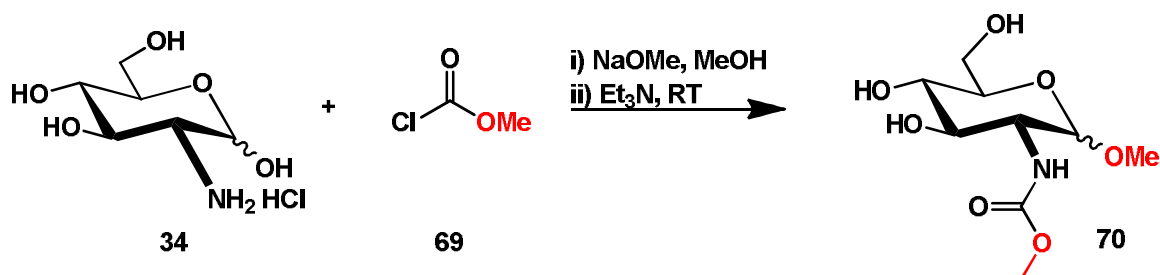
Die Auswahl der verwendeten Zucker für den zu entwickelnden Kinetik-Assay erfolgte unter verschiedenen Gesichtspunkten. Eines der wichtigsten Kriterien dabei war, dass die Neuraminsäurealdolase (NeuA) die entstehenden Sialinsäurederivate akzeptiert und zurückspalten kann. Hierbei dienten die früheren Arbeiten in unserer Arbeitsgruppe von Knorst<sup>[69]</sup>, Unruh<sup>[70]</sup> und He<sup>[46]</sup> als Vorlage. Zunächst sollte die konfigurative Flexibilität der Synthesen bezüglich des Zuckergrundgerüsts untersucht werden, wozu neben (Amino)hexosen auch mehrere Pentosen **39-41** und Deoxyzucker **42-44** ausgewählt wurden. Aus der Literatur ist bekannt, dass die *N*-Acetylneuraminsäure-Synthase aus *Neisseria meningitidis* (NeuS<sub>Nme</sub>) ein recht flexibles Verhalten gegenüber *N*-modifizierten Mannosaminderivaten zeigt.<sup>[58]</sup> Die Gruppe um Sundaram et al.<sup>[58]</sup> zeigte, dass eine aliphatische Seitenkettenverlängerung bis hin zu einem *N*-Pentanoylmannosamin von der Synthase akzeptiert und umgesetzt wird. Im Zuge dieser Arbeit sollte dieses Spektrum um verschiedene Aspekte, wie das Kürzen der Seitenkette oder eine Änderung von deren elektronischen Eigenschaften (z.B. durch Einführen von Heteroatomen), erweitert und untersucht werden. Das *N*-Azidoacetylmannosamin **8**, die *N*-Chloracetylderivate **6** und **15**, sowie die *N*-Propinoylderivate **7**, **16** und **22** wurden ausgewählt, da die daraus zugänglichen Sialinsäurederivate mittels 1,3-dipolarer Cycloaddition oder nucleophiler Halogensubstitution einfach weiter modifiziert werden könnten. Die *N*-modifizierten Substrate waren kommerziell nicht erhältlich oder schlichtweg zu teuer, weshalb sie im Rahmen dieser Arbeit aus den entsprechenden Aminoazuckern **33-35** (Schema 3.1) synthetisiert wurden. Die Synthese erfolgte über unterschiedliche einstufige Routen, je nach Form und Verfügbarkeit der Edukte. Die Synthese aller *N*-modifizierter Zucker erfolgte unter Verwendung der entsprechenden Carbonsäurechloride, -ester oder Carbonsäureanhydride. Über diese Route wurden keine zusätzlichen Aktivierungsreagentien benötigt (Schema 3.1).



**Schema 3.1:** Synthetischer Zugang zu den weiteren *N*-modifizierten Aminozuckerderivaten **2-22**. Als Edukte wurden die Aminozucker **33-35** eingesetzt und mit den entsprechenden Reagentien zum gewünschten Derivat umgesetzt.

Die Synthese der *N*-Formylderivate **3**, **11** und **21** aus den jeweiligen Aminozuckern Mannosamin **33**, Glucosamin **34**, Galactosamin **35** mit Ameisensäuremethylester **69** musste wegen der Flüchtigkeit des Ameisensäuremethylesters **69** selbst bei RT noch unter starker Rückflusskühlung durchgeführt werden. Um sicherzustellen, dass in der Reaktion genügend Ameisensäuremethylester **69** für eine hinreichende Reaktionsgeschwindigkeit zu vollem Umsatz vorhanden war, wurde dieser in einem großen Überschuß (30-50 Äquivalente) eingesetzt. Da das in der jeweiligen Reaktion entstehende Amid (*N*-Formylderivate **3**, **11** und **21**) mit fortschreitendem Reaktionsverlauf vollständig auskristallisierte, war die Isolierung und Reinigung des Produktes in diesem Falle nicht sehr zeitaufwendig, durch eine einfache Umkristallisation konnte das jeweilige Produkt **3**, **11** und **21** in reiner Form gewonnen werden. Die Synthese der *N*-Methoxycarbonylderivate **5**, **13** und **20** dagegen war problematischer. Jäger<sup>[83]</sup> hatte im Rahmen seiner Bachelorarbeit unter anderem das *N*-Methoxycarbonylglucosamin **13** synthetisiert (Schema 3.2). Schon während der im Reaktionsverlauf zur Kontrolle durchgeführten dünnschichtchromatographischen Analyse zeigte sich eine nicht unerhebliche Nebenproduktbildung. Einige dieser Nebenprodukte konnten säulenchromatographisch über Kieselgel und Ionenaustauscher abgetrennt werden. Aus der 2D-NMR-spektroskopischen Analyse der Produktfraktion wurde deutlich, dass vornehmlich ein *N*-substituiertes Glucosamin **70** entstanden war. Der für die Methoxyprotonen der Carbamatgruppe des *N*-Methoxycarbonylglucosamins **13** erwartete Peak bei einer chemischen Verschiebung von  $\delta = 3,75$  ppm war zwar im Spektrum vorhanden, zusätzlich war jedoch noch ein weiteres methylishes Protonensignal bei einer chemischen Verschiebung von  $\delta = 3,59$  ppm vorhanden, was nicht mit dem als Lösungsmittel eingesetzten Methanol identisch war. Das  $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -HMBC-NMR-Spektrum konnte den Ursprung dieses

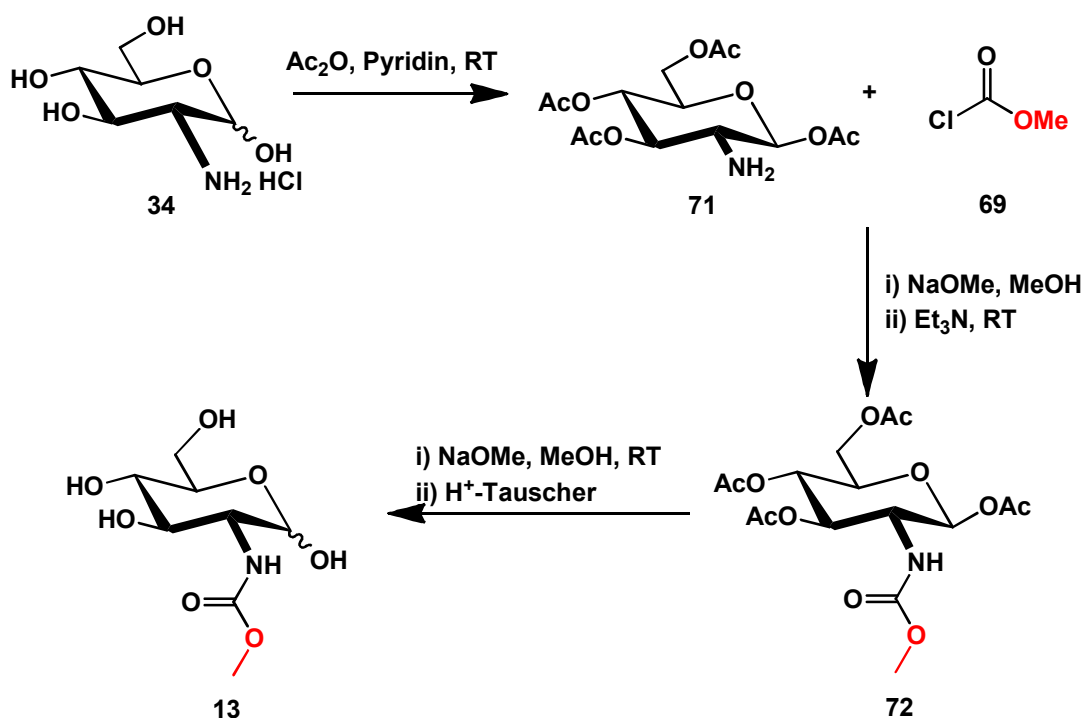
Signales aufklären. Das entstandene *N*-Methoxycarbonylglucosamin **13** war offenbar im Laufe der Reaktion am anomeren C1-Atom vollständig acetalisiert worden. Da diese Glycosidbildung mit den basischen Reaktionsbedingungen nicht kompatibel ist, bleibt als Erklärung nur, dass die eingesetzten Basenäquivalente nicht ausgereicht hatten (Schema 3.2).



**Schema 3.2:** Synthese der *N*-Methoxycarbonylderivate **5**, **13** und **20**. Unter den standardmäßigen Reaktionsbedingungen kam es zu einer unerwünschten vollständigen Acetalisierung des anomeren C1-Atoms, daraus resultierten die Nebenprodukte **70**. Dadurch musste auch diese Syntheseroute modifiziert werden.

Um die Glycosidbildung zu verhindern, wurde die Synthese des *N*-Methoxycarbonylglucosamin **13** modifiziert durchgeführt. Standardmäßig wurde in den Synthesen zu den *N*-modifizierten Aminosukern ein Äquivalentenverhältnis für die aus den Hydrochloriden freigesetzte Salzsäure zu dem als Puffer wirkenden Triethylamin von eins zu eins gewählt. Bei Änderung dieses Verhältnisses auf HCl/TEA 1:1.5, konnte die anomere Acetalisierung erfolgreich unterbunden und die Produkte **5**, **13** und **20** in guter Ausbeute erhalten werden (Tab. 3.2).

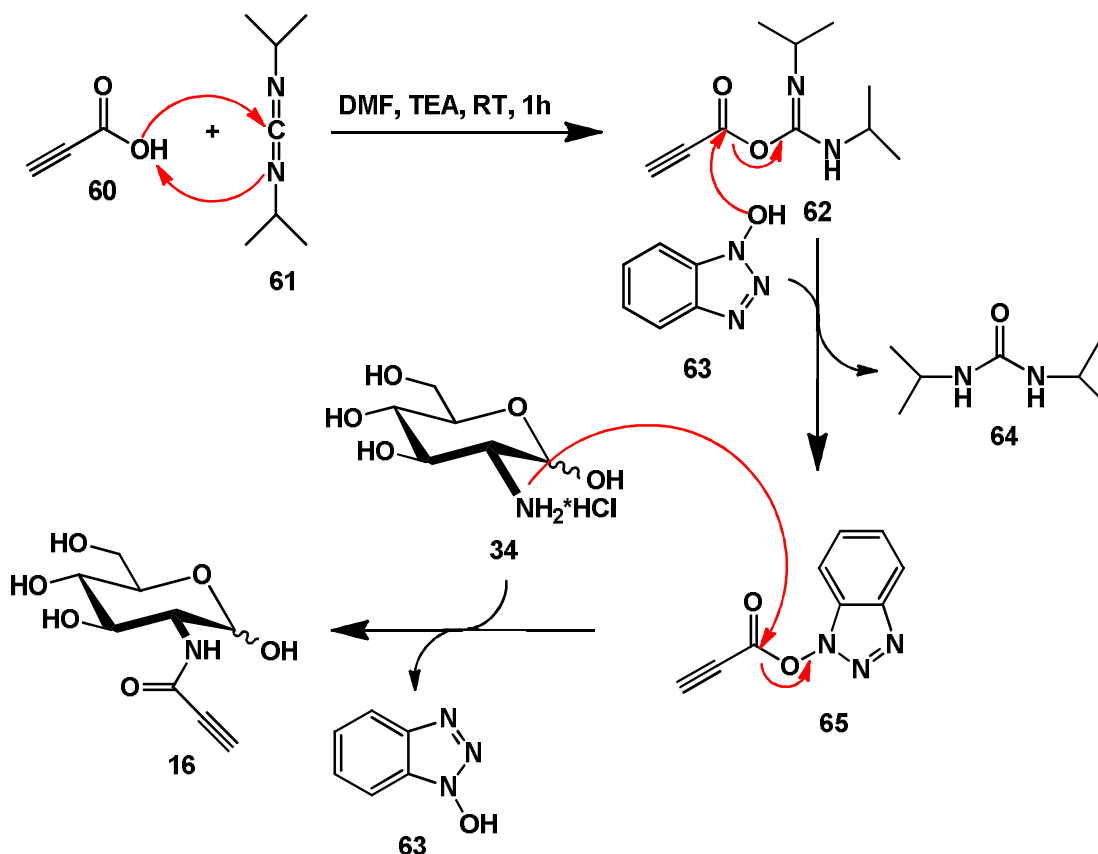
Die *N*-Methoxycarbonylderivate **5**, **13** und **20** wurden zusätzlich noch über eine andere Route synthetisiert, welche eine Glycosidbildung von vorne rein ausschloss. Schema 3.3 zeigt diese Route am Beispiel der Synthese von *N*-Methoxycarbonylglucosamin **13**. Vor der eigentlichen Synthese wurde zunächst das Glucosamin **34** peracetyliert. Die Umsetzung des peracetylierten Glucosamins **71** mit dem Ameisensäuremethylesters **69** erfolgte unter Standardreaktionsbedingungen mit einem Äquivalentenverhältnis HCl/TEA von 1:1. Nach der Synthese wurde noch ein Entschützungschritt durchgeführt, um das gewünschte *N*-Methoxycarbonylglucosamin **13** zu erhalten (Schema 3.3).



**Schema 3.3:** Synthese der *N*-Methoxycarbonylderivate **5**, **13** und **20** über die Route des entsprechenden *O*-Acyl-geschützten Aminosuckers **71** am Beispiel von *N*-Methoxycarbonylglucosamin **13**.

Mit diesen beiden Syntheserouten konnte die unerwünschte Glycosidbildung komplett ausgeschlossen werden. Beide Varianten waren sich im Zeitaufwand gleich und auch die erhaltenen Ausbeuten waren relativ ähnlich (50-70%, Tab. 3.2).

Die Synthese der *N*-Propinoylderivate **7**, **16** und **22** erfolgte über die Carbonsäureaktivierung mittels Diisopropyldiimid (DIC) **61** und 1-Hydroxybenzotriazol (HOBt) **63** (Schema 3.4).

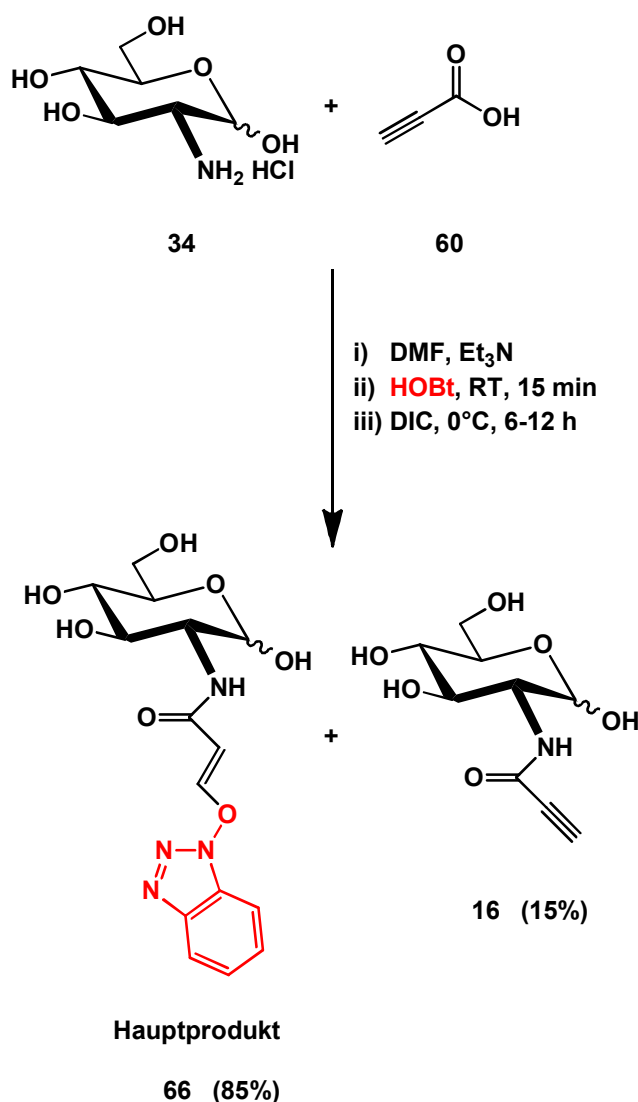


**Schema 3.4:** Syntheseroute für die *N*-Propinoylderivate am Beispiel von *N*-Propinoylmannosamin **16**.

Um die Amid-Kupplung zwischen der Propiolsäure **60** und dem Aminozucker **33** durchzuführen, musste zunächst die Carbonsäure aktiviert werden, um einen nucleophilen Angriff der freien Aminogruppe im Zucker zu erleichtern. Hierfür kann man standardmäßig Diisopropylcarbodiimid **61** verwenden. Diese Funktionalisierung überführt die Carbonsäure **60** in einen reaktiven *O*-Acylharnstoff **62**, welcher im Folgenden durch Umsetzung mit HOBT **63** zum Aktivester **65** reagiert. In diesem Aktivester ist die Elektronendichte der Carboxylatgruppe soweit verringert, dass der nucleophile Angriff erfolgen kann. Die Synthese der *N*-Propinoylderivate **7**, **16** und **22** nach diesem Protokoll zeigte nach 6-12 Stunden unter Lichtausschluss und Eiskühlung vollständigen Umsatz, was dünnschichtchromatographisch bestätigt wurde. Nach mehreren Aufreinigungsschritten zum Entfernen der entstehenden Nebenprodukte **63** und **64** konnte ein Produkt in guter Ausbeute isoliert werden. Allerdings zeigte sich in den  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Datensätzen, dass weiterhin ein Äquivalent HOBT **63** vorhanden war, welches auch durch weitere Aufreinigungsschritte nicht entfernt werden konnte, was eine kovalente Verknüpfung nahelegte. Die Analyse der 2D-NMR-Spektrensätze zeigte, dass das Problem in der Reaktivität der verwendeten Propiolsäure **60** liegt. Die terminale Alkinfunktionalität der Propiolsäure **60** wirkte offenbar als Michael-Akzeptor und

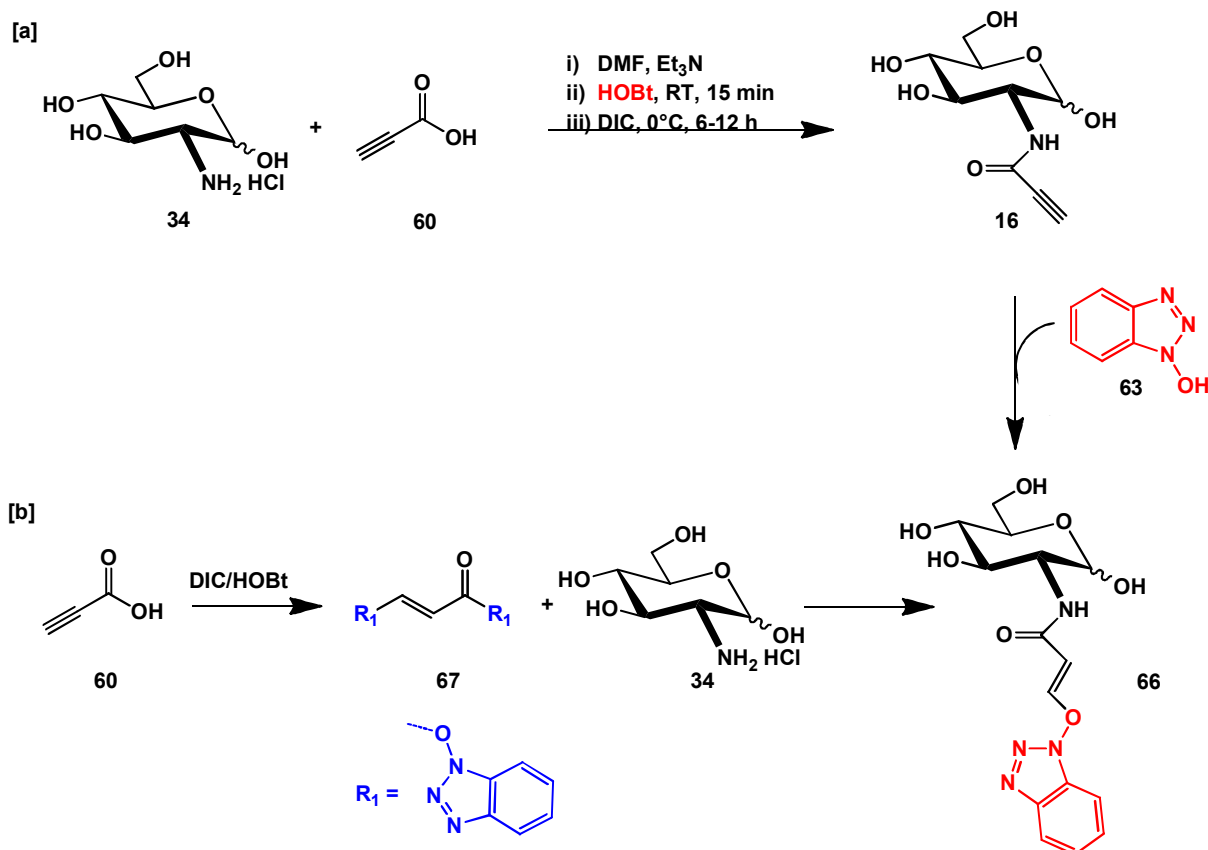


reagierte mit dem HOBt **63** weiter zu einem unerwünschten Nebenprodukt **66**, welches unter diesen Reaktionsbedingungen auch das Hauptprodukt darstellte (Schema 3.5).



**Schema 3.5:** Durch die terminale Alkinfunktionalität im *N*-Propinoylderivat **16**, welches als Michael-Akzeptor wirken kann, kommt es zur Bildung eines Produktgemisches mit dem Addukt **66** als Hauptkomponente.

Die Bildung des Nebenproduktes **66** wird durch die Abspaltung von HOBt **63** bei der Bildung des gewünschten Aminosuckers **34** begünstigt. Daher wurden verschiedene Äquivalentenverhältnisse von HOBt **63** und der Propiolsäure **60** (von 1.3:1 zu 1:2) getestet, um die Bildung des unerwünschten Nebenproduktes **66** zu unterbinden, was jedoch erfolglos blieb. Zur Bildung des Nebenproduktes sind zwei Reaktionswege denkbar (Schema 3.6).

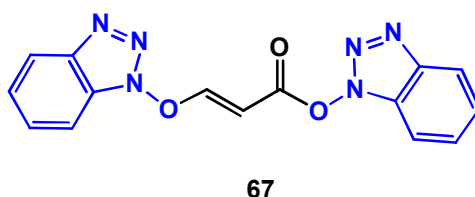


**Schema 3.6:** Mögliche Reaktionspfade zur Bildung des unerwünschten Nebenproduktes **66**. [a] Die Reaktion verläuft zunächst über die Aktivierung der Carbonsäure **60** mit DIC/HOBt zum gewünschten Produkt **16** ab. Da HOBt **63** während der Reaktion zurück gebildet wird, kann dies nun weiter mit dem Produkt **16** reagieren. [b] Alternativ es zunächst zu einer Reaktion zwischen einem Äquivalent der Propionsäure **60** und zwei Äquivalenten HOBt **63** kommen. Das daraus resultierende (*E*)-konfigurierte  $\alpha,\beta$ -ungesättigte Carbonsäurederivat **67** reagiert nun mit dem Aminozyucker **34** zum Addukt **66**.

Eine Möglichkeit der Bildung des Nebenproduktes **66** stellt die Reaktion nach dem bekannten Mechanismus der Carbonsäureaktivierung dar. Dabei wird zunächst das HOBt **63** verbraucht und im Laufe der Reaktion wieder freigesetzt, wobei am Ende der Reaktion **63** noch im Überschuß vorliegt, welches mit der terminalen Alkinfunktionalität des *N*-Propinoylglucosamin **16** reagieren und das Michaeladdukt **66** bilden kann. Denkbar wäre auch zunächst die Reaktion der terminalen Alkinfunktionalität der Propionsäure **60** mit einem Äquivalent HOBt **63**. Aus dieser Umsetzung resultiert ein (*E*)-konfiguriertes  $\alpha,\beta$ -ungesättigtes Carbonsäurederivat.

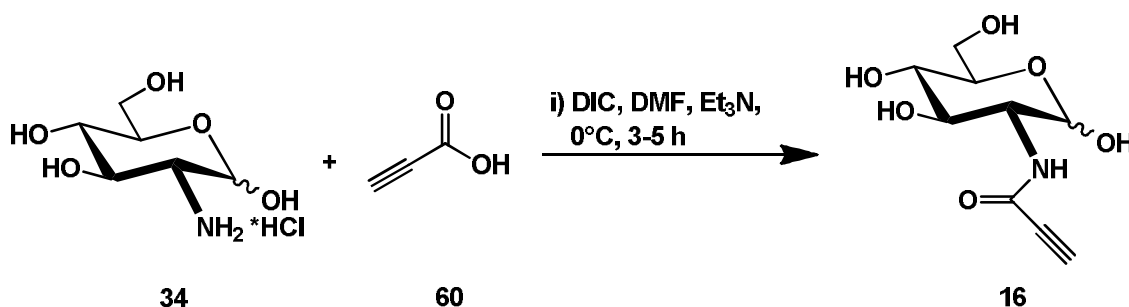
Dieses Intermediat wird im nächsten Schritt mit Diisopropyldiimid **61** zum entsprechend aktivierten *O*-Acylharnstoffderivat umgesetzt. Letzteres wird nun mit einem weiteren

Äquivalent HOBt **63** zum Aktiv-Ester **67** (Abb. 3.1) umgesetzt, der abschließend mit dem Glucosamin **34** zum Produkt **66** reagiert.



**Abbildung 3.1:** Struktur des aus einem Äquivalent Propiolsäure **60** und zwei Äquivalenten HOBt **63** entstehenden Intermediats **67**.

Erst ein Syntheserversuch ohne Zusatz von HOBt **63**, welchem die Annahme zugrunde lag, dass die Nucleophilie der Aminozucker **33-35** ausreichend hoch sein sollte, um direkt den Aktivester **62** anzugreifen, führte zur Bildung des gewünschten Amides **16** (Schema 3.7).



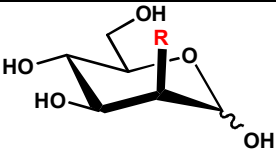
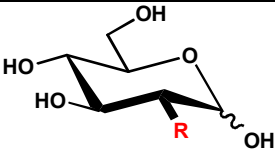
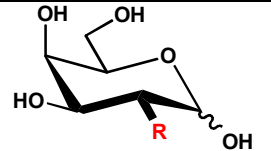
**Schema 3.7:** Modifizierte Synthese der *N*-Propinoylderivate am Beispiel von **16** aus dem entsprechenden Aminozucker **34** mit DIC **61** in Abwesenheit von HOBt **63**.

Über diese Syntheseroute, ohne die Verwendung von HOBt **63**, konnten die gewünschten *N*-Propinoylderivate **7**, **16** und **22** in guten Ausbeuten (Tab. 3.2) nach kurzer Reaktionszeit von drei bis fünf Stunden erhalten werden. Die Aufreinigung vereinfachte sich dadurch auch da nun nicht mehr zusätzlich aufwendig das HOBt **63** durch Extraktion abgetrennt werden musste.

Die Synthesen der restlichen *N*-modifizierten Aminozucker verliefen gemäß der erprobten Standardrouten (Schema 3.1). Keines der synthetisierten Produkte fiel wie die entsprechenden *N*-Formylderivate **3**, **11** und **21** während der Reaktion aus der Lösung aus. Alle Produkte wurden daher nach Entfernen des Lösungsmittels säulenchromatographisch aufgereinigt.

Die dabei erzielten Ausbeuten der im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten *N*-modifizierten Aminozuckerderivate sind in Tabelle 3.2 aufgelistet.

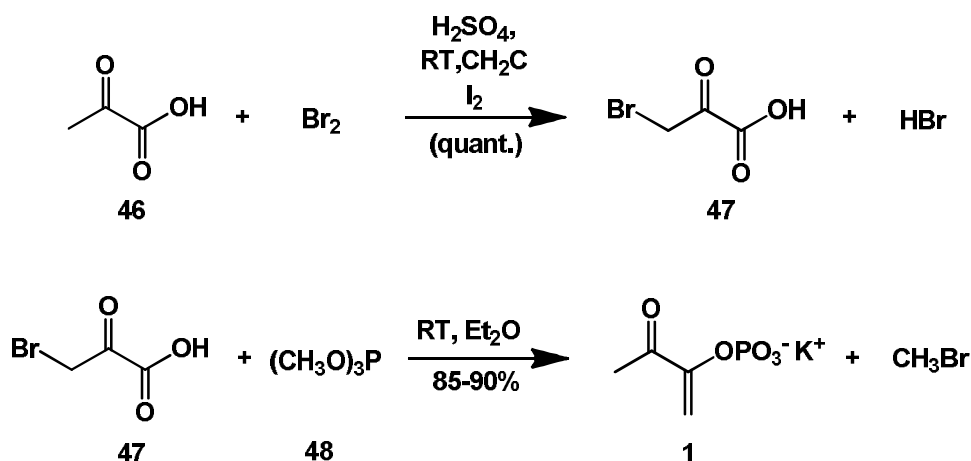
**Tabelle 3.2:** Überblick über die erhaltenen Ausbeuten an *N*-modifizierten Derivaten aus den Synthesen der jeweiligen Aminosucker.

			
<b>R</b> = NHCOAc	<b>2</b> / — <sup>[a]</sup>	<b>10</b> / 60%	<b>18</b> / 90%
<b>R</b> = NHCOH	<b>3</b> / 85%	<b>11</b> / 90%	<b>21</b> / 67%
<b>R</b> = NHCOCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	<b>4</b> / 62%	<b>12</b> / 68%	<b>19</b> / 73%
<b>R</b> = NHCO <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	<b>5</b> / 79%	<b>13</b> / 58%	<b>20</b> / 52%
<b>R</b> = NHCOCH <sub>2</sub> Cl	<b>6</b> / 93%	<b>15</b> / 79%	— <sup>[b]</sup>
<b>R</b> = NHCOCCH	<b>7</b> / 91%	<b>16</b> / 85%	<b>22</b> / 68%
<b>R</b> = NHCOCH <sub>2</sub> N <sub>3</sub>	<b>8</b> / 90%	— <sup>[b]</sup>	— <sup>[b]</sup>
<b>R</b> = NHCOCH <sub>2</sub> OH	<b>9</b> / 54%	— <sup>[b]</sup>	— <sup>[b]</sup>

[a] *N*-Acetylmannosamin wurde kommerziell erworben. [b] diese Derivate von Glucosamin und Galactosamin wurden nicht synthetisiert.

### 3.1.2 Synthese von Phosphoenolpyruvat (PEP)

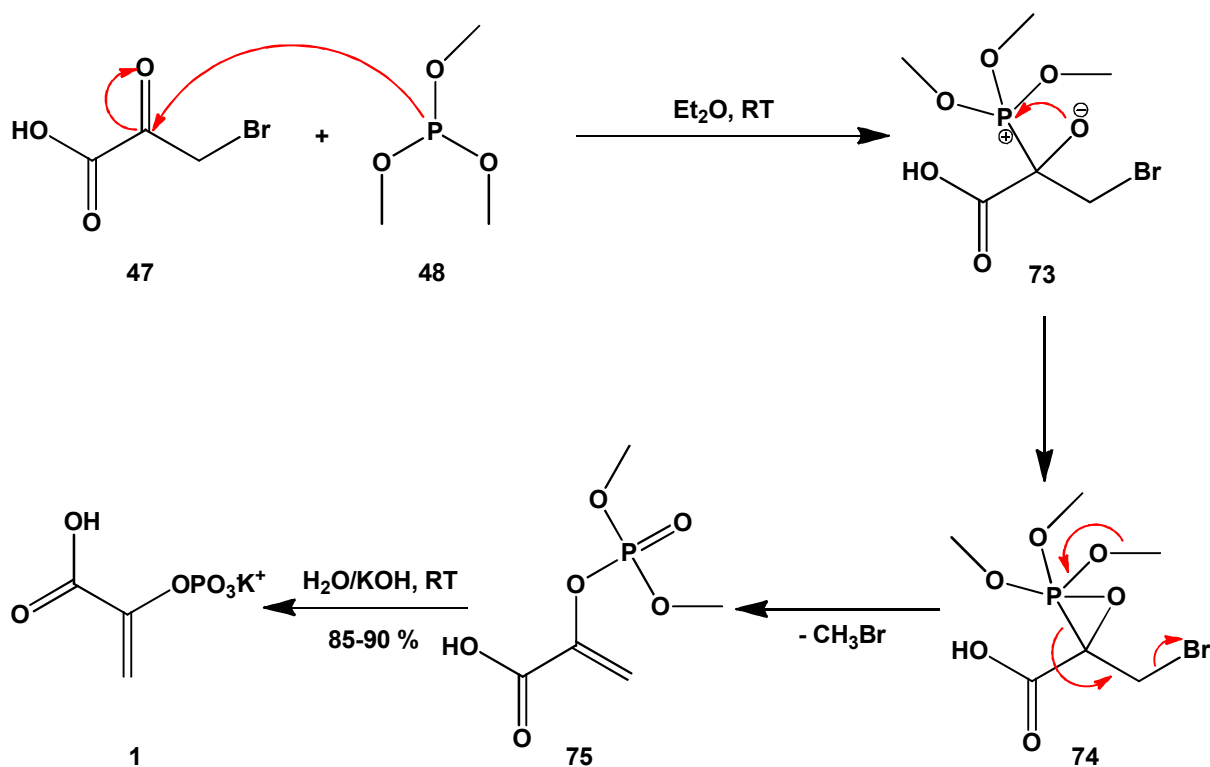
Für die präparativen Synthesen mit und die kinetischen Studien zu den Sialinsäuresynthasen NeuS<sub>Nme</sub>, NeuS<sub>Cje</sub> und PseS<sub>Cje</sub> wurde neben den *N*-modifizierten Aminozyucker **2-22** ebenfalls noch Phosphoenolpyruvat **1** als zweites natürliches Substrat der PEP-abhängigen Synthesen in größeren Mengen benötigt. Da diese Substanz zu teuer war, wurde PEP **1** über eine zweistufige Route selbst synthetisiert (Schema 3.8)



Schema 3.8: Syntheseroute für PEP **1** ausgehend von Brenztraubensäure **46**.

In der ersten Stufe der Synthese wurde Brenztraubensäure **46** mit elementarem Brom in die 3-Brombrenztraubensäure **47** überführt. Nach Beendigung der Reaktion wurde überschüssiges Brom durch Zugabe von Cyclohexen entfernt und die ausgefallene 3-Brombrenztraubensäure **47** abgesaugt. Die Trocknung des Produktes erfolgt über KOH-Plätzchen für 72 Stunden im Exsikkator. Da die 3-Brombrenztraubensäure **47** trotz intensiver Trocknung über KOH-Plätzchen nicht vollständig von der Bromwasserstoffsäure befreit werden konnte, wurde auf die Bestimmung der Ausbeute und eventuelle Reinheitskontrollen verzichtet und das komplette Rohprodukt direkt weiter umgesetzt.

In der zweiten Stufe wurde **47** mit Trimethylphosphit **48** zu Phosphoenolpyruvat (PEP) **1** umgesetzt. Bei dieser Reaktion handelt es sich um die Perkow-Reaktion<sup>[84]</sup>, wobei eine  $\alpha$ -Halogenketoverbindung (**47**) mit Trimethylphosphit **48** zum entsprechenden Vinylphosphat umgesetzt wird. Eine mechanistische Beschreibung dieser Reaktion sieht wie folgt aus (Schema 3.9).



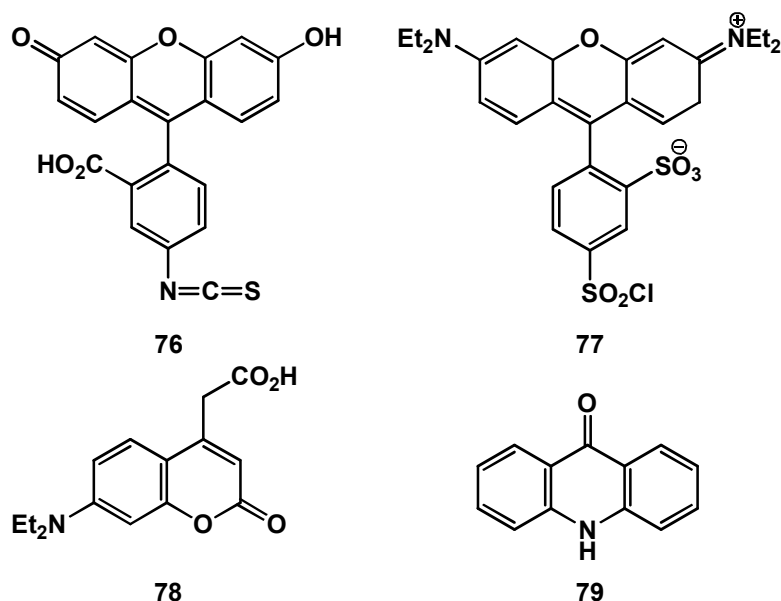
**Schema 3.9:** Möglicher Reaktionsmechanismus für die zweite Stufe der Synthese von PEP **1**. Bei der Reaktion wird eine  $\alpha$ -Halogenketoverbindung **47** mit Trimethylphosphit **48** zum entsprechenden vinyischen Phosphorsäureester umgesetzt.<sup>[84]</sup>

Zunächst erfolgt ein nucleophiler Angriff des freien Elektronenpaares des Phosphors im Trimethylphosphit **48** auf das Kohlenstoffatom der Ketofunktionalität der 3-Brombrenztraubensäure **47**. Danach folgt eine Umlagerung des Phosphitrestes über ein *in situ* gebildetes epoxid-artiges Intermediat **74** auf das Sauerstoffatom der ehemaligen Ketofunktionalität der 3-Brombrenztraubensäure **47**, unter Abspaltung von Brommethan entsteht daraus der entsprechende vinyliche Phosphorsäureester **75**. Um daraus das gewünschte Phosphoenolpyruvat **1** in Form des Monokaliumsalzes zu erhalten, wurde das Lösungsmittel entfernt, der gelbliche Rückstand in H<sub>2</sub>O aufgenommen und unter Eiskühlung mit KOH-Plättchen versetzt, bis sich das ölige Produkt komplett gelöst hatte. Danach wurde das Produkt aus dieser Lösung durch Zugabe von 95 % Ethanol ausgefällt, wobei Phosphoenolpyruvat **1** annähernd quantitativ in sehr guter Reinheit isoliert werden konnte.

### 3.1.3 Chemische Synthese des Acridon-verknüpften Lactosylakzeptors (23)

Die enzymatisch mit den Sialinsäuresynthasen in den präparativen Synthesen gewonnenen neuartigen Sialinsäurederivate sollten zunächst durch die CTP-abhängige CSS<sub>Nme</sub> aktiviert

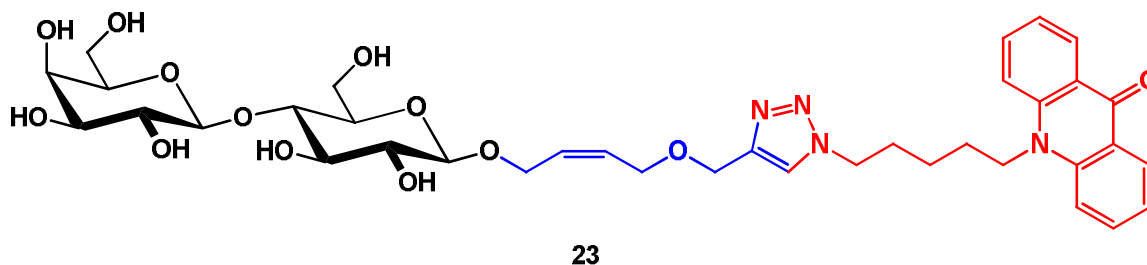
und die resultierenden CMP-aktivierten Sialinsäuren als Donor mit einer Sialyltransferase auf einen Glucosylakzeptor übertragen werden. Ein effektives System mit dem sich erfolgreich der Transfer der jeweiligen Donorsubstrate auf den Lactosylakzeptor detektieren lässt, ergibt sich aus der zusätzlichen Kombination des Glucosylakzeptors mit einem Fluoreszenzchromophor. Diese Fluoreszenzchromophore wurden schon zum Nachweis und der Charakterisierung einer breiten Palette von unterschiedlichen Verbindungen, darunter unter anderem Kohlenhydrate, Phospholipiden oder Proteinen, eingesetzt. Für die sehr wertvollen CMP-Donorsubstrate hat der Sialyltransfer auf einen fluoreszenzmarkierten Akzeptor den großen Vorteil, dass diese Reaktion vor einer präparativen Synthese in Mikromaßstab getestet und gegebenenfalls optimiert werden kann. In der Literatur sind viele Akzeptoren beschrieben, welche Fluoreszenzchromophore (Derivate von Fluorescein **76**<sup>[85]</sup>, Rhodamin **77**<sup>[86-88]</sup>, Cumarin **78**<sup>[89]</sup> und Acridon **79**<sup>[69-70]</sup>) als Marker besitzen, womit sich aufgrund der hoch empfindlichen Nachweisgrenzen unterschiedliche Transferasereaktionen, wie zum Beispiel Galactosyl- oder Sialyltransferasereaktionen, verfolgen lassen. (Abbildung 3.2)



**Abbildung 3.2:** Beispiele für häufig verwendete Fluoreszenzchromophore sind Derivate von Fluorescein (FITC) **76**, Rhodamin (Lissamin<sup>TM</sup>) **77**, Cumarin **78** und Acridon **79**.

In unserer Arbeitsgruppe hat sich. He<sup>[46]</sup> im Rahmen ihrer Arbeit unter anderem mit der Untersuchung verschiedener Acridon-gelabelter Glucosylakzeptoren beschäftigt. Die Verwendung von Acridon **79** als Chromophor bietet verschiedene Vorteile gegenüber den anderen möglichen Verbindungen **76-78**. Acridon **79** weist eine sehr hohe Quantenausbeute

und eine hohe chemische und photochemische Stabilität auf. Letzteres zeigt sich in der im Vergleich zu anderen Chromophoren sehr niedrigen optischen Nachweisgrenze solcher Acridon-gelabelter Verbindungen von 1 pmol/L bei einer Anregung von  $\lambda = 254$  nm. Desweiteren ist der synthetische Zugang zu Acridon **79** aus kommerziell verfügbaren preiswerten Grundchemikalien leicht möglich.<sup>[90]</sup> Acridon **79** und dessen Derivate werden als Fluoreszenzchromophore, aufgrund ihrer hohen Quantenausbeute, zum Screenen katalytischer Antikörper<sup>[91]</sup> und zur Detektion von DNA<sup>[92-94]</sup> verwendet. Bestimmte Acridonalkaloide finden sich in Medikamenten gegen Malaria<sup>[95]</sup> und Krebs.<sup>[96-97]</sup> Ein weiterer wichtiger Vorteil, den die Verwendung von Acridon bietet, sind die hydrophoben Eigenschaften des Aromaten. Durch diese Eigenschaften vereinfacht sich die Aufreinigung der aus den Sialyltransferreaktionen erhaltenen Acridon-gelabelten Verbindungen. Bei einem säulenchromatographischen Schritt über *RP*-C<sub>18</sub>-Kieselgel binden die Substrate über *van-der-Waals*-Kräfte reversibel an die Festphase. Durch einfaches Spülen der Säule mit Wasser werden wasserlösliche Nebenprodukte und überschüssige Edukte abgetrennt. Nachfolgende Elution mit einem steigenden Methanolgradienten liefert das Produkt in reiner Form, wobei die Elution meist mit 30-40% Methanol stattfindet. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der in Abbildung 3.3 gezeigte Acridon-markierte Lactosylakzeptor **23** verwendet, der von He<sup>[46]</sup> entwickelt wurde. Zwischen dem Lactosylrest und dem Acridonmarker ist zusätzlich noch ein Spacer eingebaut, der einerseits dazu dient, eine ausreichende sterische Flexibilität der Substrate zu gewährleisten und andererseits enthält der Spacer eine allylische Doppelbindung. Diese Doppelbindung kann ozonolytisch gespalten werden um Konjugationsmöglichkeiten zu schaffen und dadurch eventuell Zugang zu neuartigen Glycoproteinen zu bekommen.

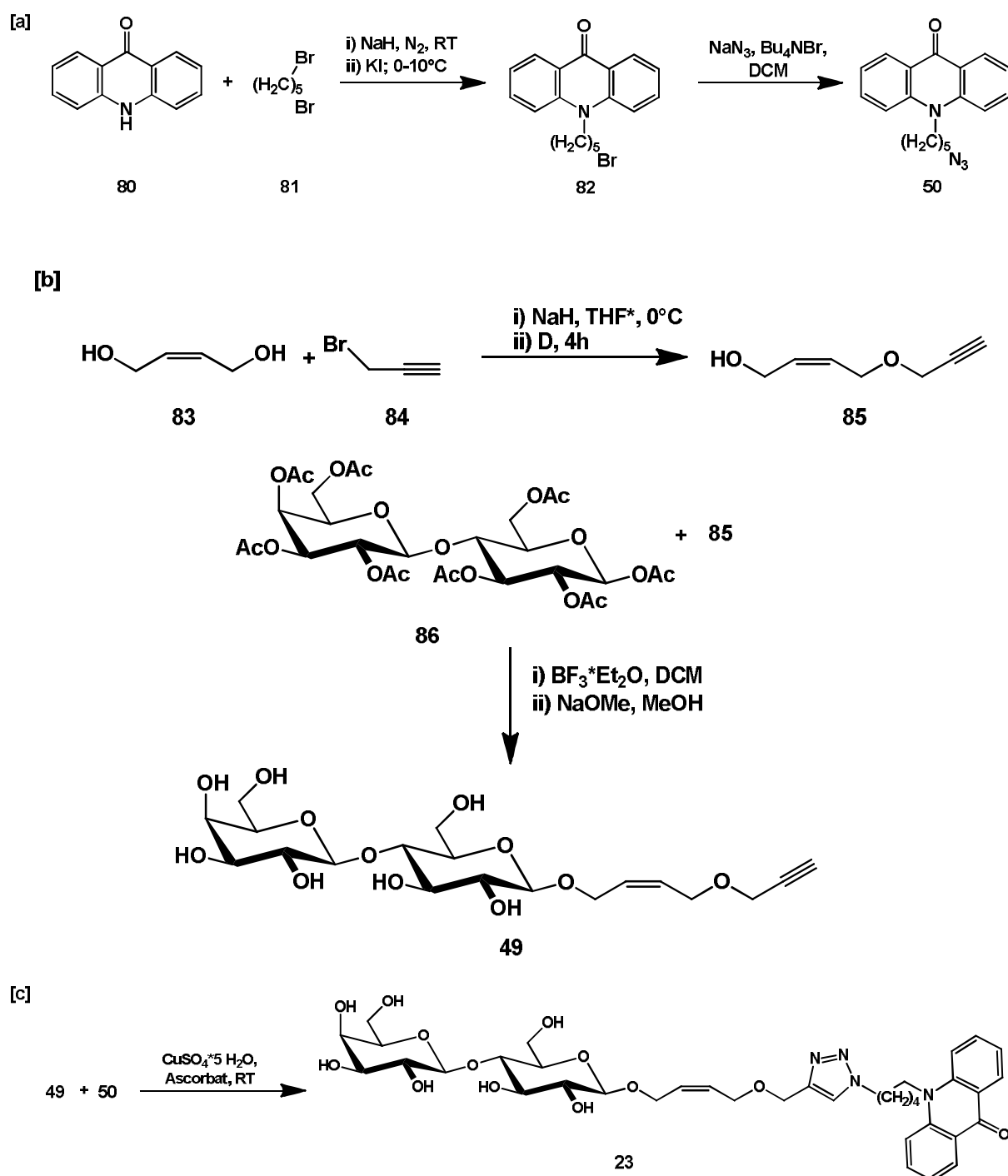


**Abbildung 3.3:** Struktur des verwendeten Acridon-gelabelten Lactosylakzeptors **23**.<sup>[46]</sup>

Die Synthese dieses Acridon-gelabelten Lactosylakzeptors **23** erfolgte über eine mehrstufige Route. Für die Cu(I)-katalysierte Alkin-Azid-Cycloaddition (CuAAC) zu **23** mussten



zunächst die dafür benötigten Edukte, das Alkynyl-Lactosid **49** und das *N*-(Azidopentyl)acridon **50**, synthetisiert werden (Schema 3.10).

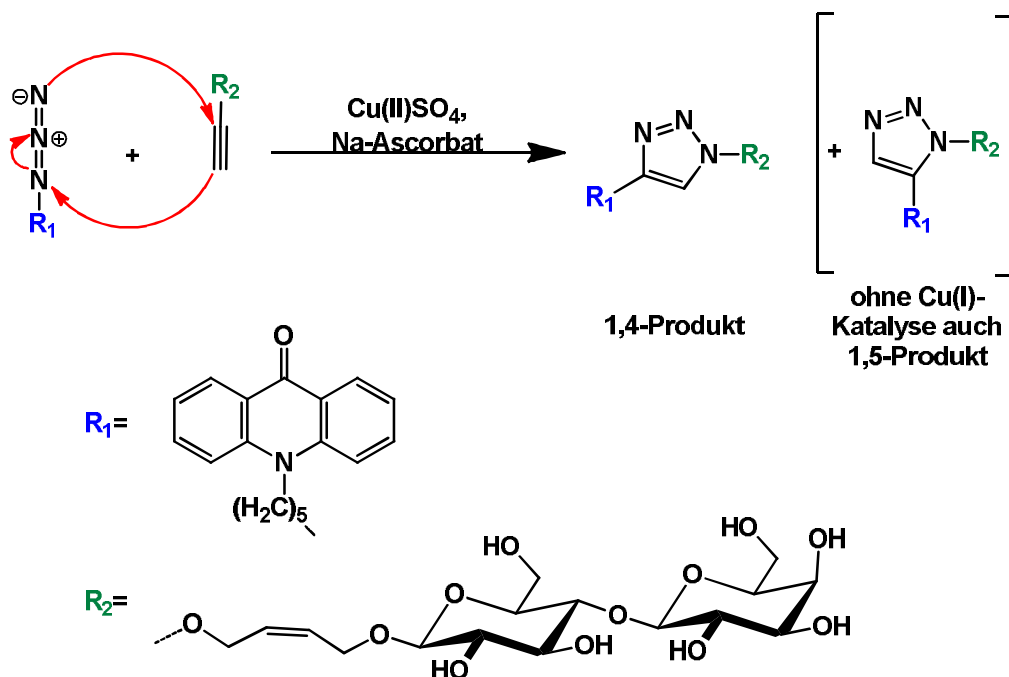


**Schema 3.10:** Syntheseroute für den Acridongelabelten Akzeptor **23**: [a] Synthese von *N*-(Azidopentyl)acridon **50**, [b] Synthese von Alkynyl-Lactosid **49** und [c] CuAAC zwischen **49** und **50**.

Ausgehend von Acridon **80** wurde zunächst das Azidopentylacridon **50** synthetisiert. Durch Deprotonierung von Acridon **80** mit NaH und anschließender *N*-Alkylierung entstand das

bromierte Zwischenprodukt 10-(5-Brompentyl)-10*H*-acridin-9-on **82**. Dieses Zwischenprodukt wurde in der nächsten Stufe durch Azidsubstitution mit NaN<sub>3</sub> in Anwesenheit von Tetrabutylammoniumbromid (Bu<sub>4</sub>N<sup>+</sup>Br<sup>-</sup>) als Phasentransferkatalysator zum 10-(5-Azidopentyl)-10*H*-acridin-9-on **50** umgesetzt. Die Synthese des Alkynyl-Lactosids **49** erfolgte durch Glucosylierung aus peracetylierter Lactose (LacAc<sub>8</sub>) **86** und dem Alkohol **85** mit BF<sub>3</sub>·Et<sub>2</sub>O als Lewis-Säure mit anschließender Entschützung. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Synthese des Acridon-gelabelten Lactosylakzeptors **23** nur auf der letzten Synthesestufe durchgeführt (Schema 3.10 [c]), da von den benötigten Vorstufen **49** und **50** noch ausreichende Mengen vorhanden waren. Für detaillierte, vertiefende Syntheseinformationen zu den weiteren jeweiligen Vorstufen wird auf die Arbeit von He<sup>[46]</sup> verwiesen.

Das Konzept der „Click-Chemie“ wurde Anfang des 21. Jahrhunderts von K.B. Sharpless begründet<sup>[98]</sup>, welches die Möglichkeit einer schnellen, effizienten Synthese großer Molekülstrukturen aus kleinen Startmolekülen beschreibt. Damit eine chemische Transformation diesem Konzept entspricht, muss sie gewisse Kriterien erfüllen.<sup>[98-99]</sup> Eine dieser Click-Reaktionen ist die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Cycloaddition zur Synthese des Acridon-gelabelten Lactosylakzeptors **23**, welche in der Literatur heute als Cu(I)-katalysierte Azid-Alkin-Cycloaddition (CuAAC) bezeichnet wird (Schema 3.11).



**Schema 3.11:** Cu(I)-katalysierte Azid-Alkin-Cycloaddition (CuAAC) mit *N*-(Azidopentyl)acridon **50** (**R**<sub>1</sub>) und Alkynyl-Lactosid **49** (**R**<sub>2</sub>).

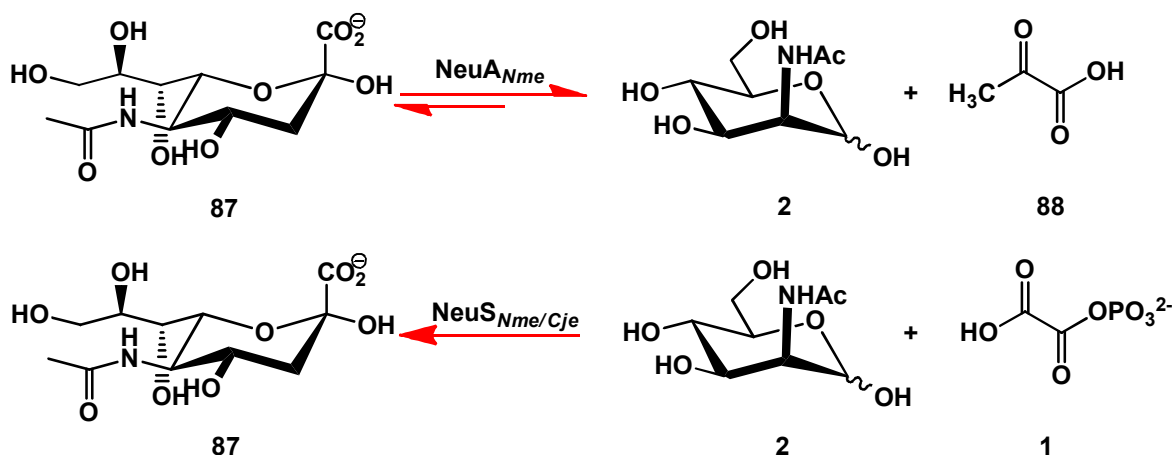
---

Für die Wahl der Cu(I)-katalysierten Variante gibt es mehrere Gründe. Zum einen wird dadurch anders als bei der nach Huisgen thermisch induzierten Variante regiospezifisch nur das 1,4-Regioisomer erhalten, und zum anderen führt die Verwendung des Kupferkatalysators zu einer Absenkung der Aktivierungsbarriere und damit verbunden zu einer bis zu  $10^7$ -fach schnelleren Umsetzung.<sup>[98-99]</sup> Der katalytische Zyklus wird durch Reduktion des als CuSO<sub>4</sub> eingesetzten Cu(II) mittels Natriumascorbat zur Freisetzung der katalytisch aktiven Cu(I)-Spezies gestartet (Schema 3.12). Nach der Koordination der Alkin- **49** und der Azidokomponente **50** an die aktive Cu(I)-Spezies wird der Triazolring gebildet. Nachfolgende Protonierung führt zur Dissoziation des Produktes **23** und der Regeneration der katalytischen Cu(I)-Spezies. Durch Verwendung eines Überschusses an Natriumascorbat wird zusätzlich die Bildung von oxidativen Homokupplungsprodukten verhindert.<sup>[99-100]</sup>



## 3.2 Enzymatische Synthese von Sialinsäuren und Derivaten

Um einen effektiven und einfachen präparativen Zugang zu neuen, interessanten Sialinsäurederivaten zu bekommen, sind die PEP-abhängigen Sialinsäuresynthasen aus pathogenen Mikroorganismen von großem Interesse (Schema 3.13). Diese Synthasen bieten im Gegensatz zu der chemischen Synthese<sup>[101-103]</sup> von Sialinsäuren den Vorteil, dass die von ihnen katalysierten Reaktionen einstufig sind und keinerlei Schutzgruppenchemie benötigen. Des Weiteren ist die von den Synthasen katalysierte Reaktion irreversibel und nicht wie die weitläufig benutzte enzymatische Syntheseroute mit der Neuraminsäurealdolase aus *Neisseria meningitidis* (NeuA<sub>Nme</sub>) eine Gleichgewichtsreaktion, deren Gleichgewicht auf der Seite des als Edukt verwendeten ManNAc **2** liegt. Dies muss typischerweise durch einen Überschuß an Pyruvat **88** kompensiert werden, um das Gleichgewicht zur Produktseite zu verschieben.<sup>[104-105]</sup>



**Schema 3.13:** Mögliche Routen zur enzymatischen Synthese von Neu5Ac **87** mit der *N*-Acetylneuraminsäurealdolase NeuA<sub>Nme</sub> und den *N*-Acetylneuraminsäuresynthasen NeuS<sub>Nme</sub> und NeuS<sub>Cje</sub>.

---

### 3.2.1 Enzymatische Synthesen mit den PEP-abhängigen Sialinsäuresynthasen aus *Campylobacter jejuni*

#### 3.2.1.1 Präparative Synthesen mit den Sialinsäuresynthasen PseS<sub>Cje</sub> und dem NeuB2-Protein

Vor den präparativen Synthesen wurden zunächst mit den Synthasen qualitative Substrattests im kleinen Maßstab angesetzt und dünnschichtchromatographisch verfolgt. Diese Reaktionen wurden in einem Volumen von 500 µl in Eppendorfgefäßen bei unterschiedlichen Temperaturen von 20°C, 37°C, 50°C und 60°C durchgeführt. Als Puffer für die Reaktionen wurde 50 mM Tris pH 7.6 mit 50 mM MgCl<sub>2</sub> oder 50 mM MnCl<sub>2</sub> eingesetzt. Die eingesetzte Konzentration an den Zuckern betrug 50 mM pro Ansatz, von der jeweiligen Synthese wurden zunächst 10 mg verwendet. Bei sehr langsam verlaufenden Reaktionen wurde immer wieder frische Synthese nachdosiert, bei stündlicher Reaktionskontrolle mittels Dünnschichtchromatographie. Bei den Testreaktionen mit der *N*-Acetylneuraminsäuresynthase NeuS<sub>Cje</sub> konnte für *N*-Acetylmannosamin **2** als natürlichem Substrat nach zwei Stunden vollständiger Umsatz im Dünnschichtchromatogramm nachgewiesen werden, am schnellsten lief die Reaktion bei 37°C. Die Aktivität der Synthese NeuS<sub>Cje</sub> war auch bei 50°C vorhanden, bei 20°C und 60°C konnte keine Produktbildung nachgewiesen werden. Bei den Testreaktionen mit den Substraten *N*-Methoxycarbonylmannosamin **5**, *N*-Propinoylmannosamin **7** und NeuS<sub>Cje</sub> konnte nach mehreren Stunden ein mäßiger Umsatz dünnschichtchromatographisch detektiert werden. Daneben konnte in den Ansätzen mit D-Xylose **40**, D-Lyxose **41** und den beiden 2-Deoxyzuckern **42** und **43** nach längeren Reaktionszeiten nur sehr schwache Spots, detektiert werden, welche auf eine mögliche Produktbildungen hinweisen. Die *R<sub>f</sub>*-Werte der neuen Spots waren dem *R<sub>f</sub>*-Wert der als Referenz eingesetzten *N*-Acetylneuraminsäure **87** ähnlich. Für die beiden Synthasen PseS<sub>Cje</sub> und das NeuB2-Protein konnten in den Substrattests bei 37°C für *N*-Acetylglucosamin **10** und *N*-Acetylgalactosamin **18** im Dünnschichtchromatogramm unvollständige Produktbildung detektiert werden, für *N*-Propinoylgalactosamin **22** war ebenfalls ein sehr schwacher Spot mit fast gleichem *R<sub>f</sub>*-Wert wie der Referenz Neu5Ac **87** detektierbar. Bei den Testansätzen, die bei 60°C inkubiert wurden, konnten mit der PseS<sub>Cje</sub> für *N*-Acetylglucosamin **10** und *N*-Acetylgalactosamin **18** ebenfalls unvollständige Produktbildung im Dünnschichtchromatogramm detektiert werden, diese war jedoch schwächer im Vergleich zu denjenigen bei 37°C und kürzerer Reaktionszeit.

Die Ergebnisse mit den in diesen Substrattests eingesetzten Zuckern sind in Tabelle 3.3 dargestellt.

**Tabelle 3.3:** Überblick über die Ergebnisse für die in den Substrattests mit den beiden Synthasen NeuS<sub>Cje</sub> und PseS<sub>Cje</sub> eingesetzten Zucker.

Substrat	NeuS <sub>Cje</sub>	PseS <sub>Cje</sub>
<b>2</b>	quant.	n.v.
<b>5</b>	++	n.v.
<b>7</b>	++	n.v.
<b>10</b>	n.v.	++
<b>18</b>	n.v.	++
<b>22</b>	n.v.	+
<b>36</b>	n.v.	—
<b>37</b>		—
<b>38</b>		—
<b>40</b>	+	—
<b>41</b>	+	—
<b>42</b>	+	—
<b>43</b>	+	—

++: mäßiger Umsatz (20-40 Prozent); +: schwacher Umsatz (5-10 Prozent); —: kein Umsatz detektierbar;  
n.v.: Zucker für diese Synthese nicht als Substrat verwendet

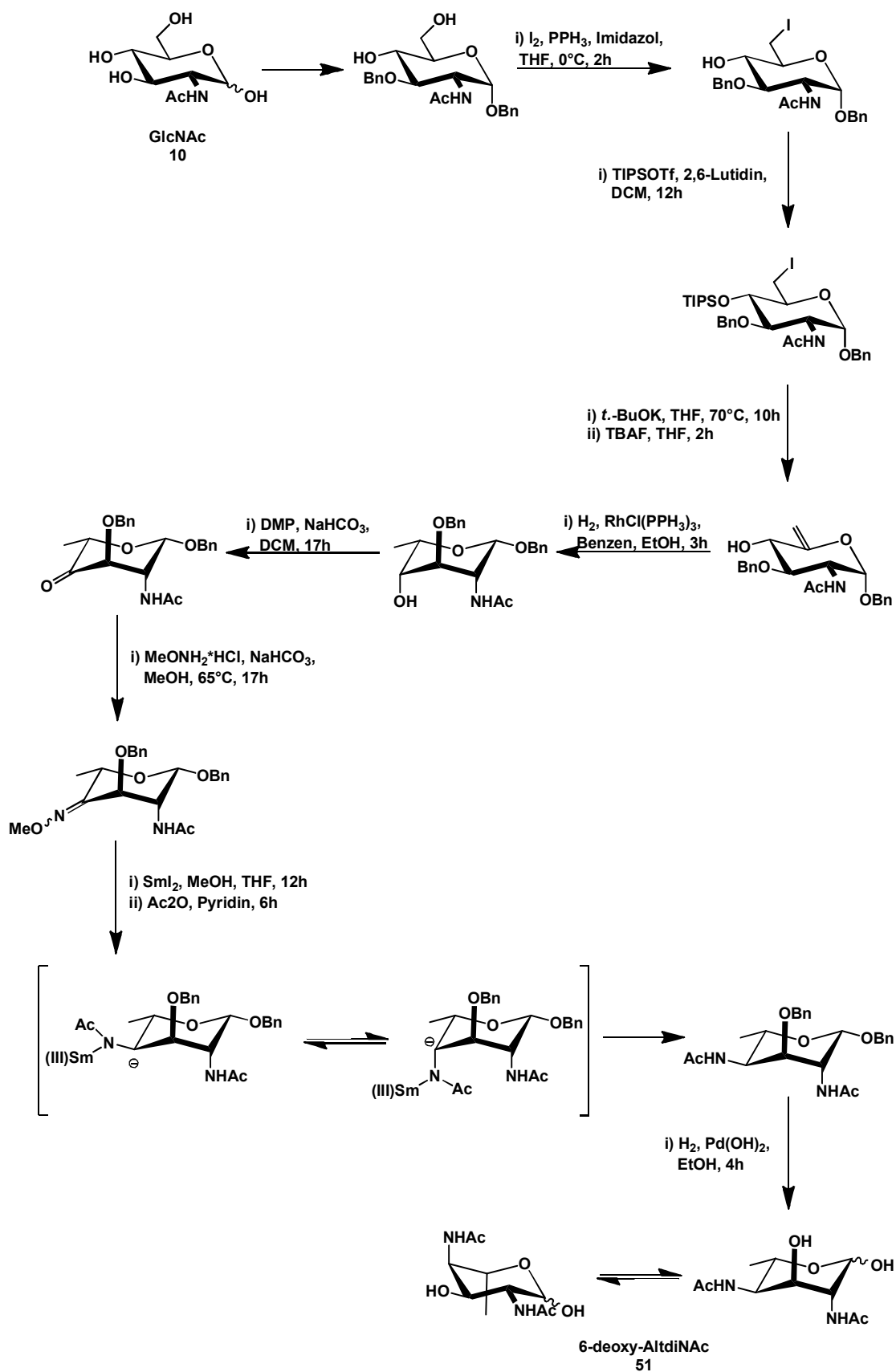
Die Pseudaminsäuresynthase PseS<sub>Cje</sub> katalysiert die letzte Stufe im Pseudaminsäurebiosyntheseweg in pathogenen Mikroorganismen wie *Campylobacter jejuni* und *Helicobacter pylori*.<sup>[80]</sup> Als Edukt und gleichzeitig als natürliches Substrat verwendet die Synthase 2,4-Diacetamido-2,4,6-trideoxy-L-altrose (6-deoxy-AltdiNAc) **51**. Dieser Zucker ist kommerziell nicht verfügbar und im Labor nur über längere Syntheserouten<sup>[106-107]</sup>, ausgehend von *N*-Acetylglucosamin **10**, als Edukt zu synthetisieren. Die Gesamtausbeute am gewünschten Zuckerderivat **51** beträgt über alle Stufen 34% (Schema 3.14).<sup>[107]</sup> Unter anderem wegen des hohen Syntheseaufwandes wurde im Rahmen dieser Arbeit auf die Synthese des natürlichen Substrates für die Pseudaminsäuresynthase PseS<sub>Cje</sub> verzichtet. Als Substrate für die Synthesen mit den jeweiligen Synthasen PseS<sub>Cje</sub> und dem NeuB2-Protein

---

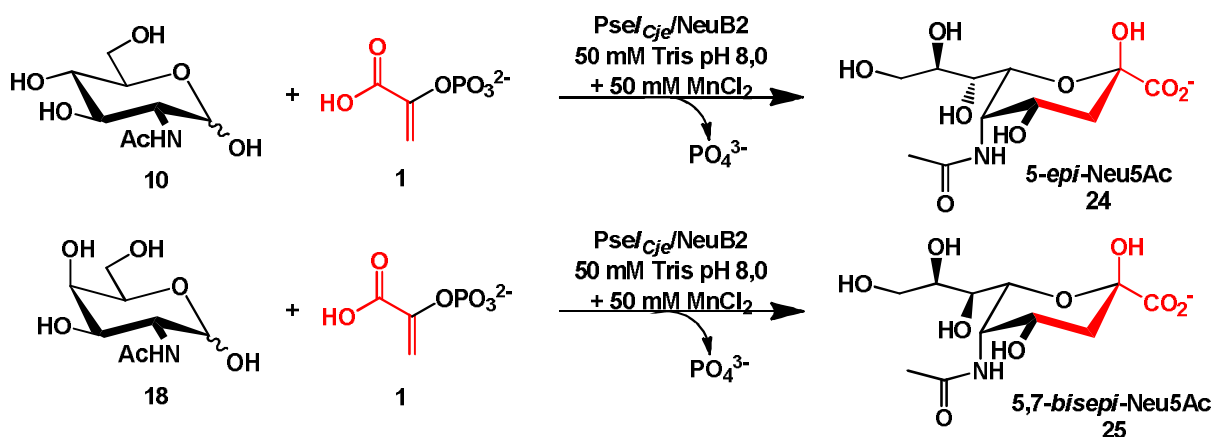
wurde stattdessen *N*-Acetylglucosamin **10** und *N*-Acetylgalactosamin **18** eingesetzt (Schema 3.15).

*N*-Acetylgalactosamin **18** kommt konstitutiv und konfiguratv dem natürlichen Substrat 6-deoxy-AltdiNAc **51** am nächsten, die Konfiguration an der C4-Position wird nicht geändert. Allerdings ändern sich durch die Substitution der an dieser Stelle im natürlichen Substrat vorhandenen *N*-Acetylgruppe gegen eine Hydroxygruppe und der zusätzlichen Hydroxygruppe an C6-Position der sterische Anspruch sowie die elektronischen Eigenschaften des Zuckers. Mit *N*-Acetylglucosamin **10** als Substrat kann auch gleich in den präparativen Synthesen die konfigurative Flexibilität der Synthasen getestet werden. Bei den in den Synthesen entstehenden Sialinsäuren handelt es sich um Epimere der *N*-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac), das Produkt aus der Umsetzung von *N*-Acetylglucosamin **10** ist die 5-*epi*-*N*-Acetylneuraminsäure (5-*epi*-Neu5Ac) **24** und aus *N*-Acetylgalactosamin **18** entsteht die entsprechende 5,7-*bisepi*-*N*-Acetylneuraminsäure (5,7-*bisepi*-Neu5Ac) **25**.





**Schema 3.14:** Chemische Syntheseroute für das natürliche Substrat 6-Deoxy-AltdiNAc **51** der Pseudaminsäuresynthese  $\text{PseS}_{Cje}$ .<sup>[107]</sup> Diese mehrstufige Synthese liefert das Produkt mit einer Gesamtausbeute über alle Stufen von 34%.



**Schema 3.15:** Präparative Synthesen mit den beiden PEP-abhängigen Synthasen PseS<sub>Cje</sub> und dem NeuB2-Protein, sowie den Zuckern **10** und **18**.

Für die präparativen Synthesen mit den beiden Synthasen mit PseS<sub>Cje</sub> und dem NeuB2-Protein wurde ein Reaktionsvolumen von 5 ml (50 mM Tris, pH 8.0, 50 mM MnCl<sub>2</sub>) verwendet. Das Äquivalentenverhältnis zwischen den jeweiligen Edukten **10,18** und PEP **1** wurde 1:1 gewählt, wobei die Zugabe von PEP, basierend auf den Erfahrungen von Unruh<sup>[70]</sup>, in mehreren Dosen über einen längeren Zeitraum erfolgte. Im Laufe der Reaktion entsteht anorganisches Phosphat, welches mit dem für die katalytische Aktivität der Synthasen erforderlichen Mn<sup>2+</sup> einen schwerlöslichen Niederschlag bildet. Der dadurch bedingte Verlust an Mn<sup>2+</sup>-Ionen wurde durch regelmäßiges Nachdosieren von MnCl<sub>2</sub> ausgeglichen. Während der Reaktion wurde stündlich der pH-Wert der Reaktion kontrolliert und bei Bedarf mit 1 M NaOH-Lösung nachjustiert. Der Reaktionsfortschritt wurde dünnschichtchromatographisch verfolgt. Die ersten Spuren an Produktbildung konnten in den Ansätzen nach etwa 48 Stunden im Dünnschichtchromatogramm detektiert werden. Nach einer Reaktionszeit von etwa 96 Stunden konnte in keinem der Ansätze, trotz mehrmaliger Zugabe an frischem Enzym, keine weitere Umsatzsteigerung im Dünnschichtchromatogramm beobachtet werden, worauf die Reaktionen beendet wurden. Um die in den jeweiligen Ansätzen entstandenen Produkte in reiner Form zu isolieren, waren mehrere Aufreinigungsschritte notwendig. Im ersten Schritt mussten die in den Reaktionslösungen vorhandenen Synthasen entfernt werden, wofür zwei Methoden zur Auswahl standen. Mittels Ethanolpräzipitation lassen sich Enzyme schnell und einfach denaturieren und ausfällen, jedoch besteht bei dieser Methode die Gefahr, dass mit dem denaturierten Enzym auch ein Teil des Produktes ausfällt, was Jäger<sup>[83]</sup> im Rahmen seiner Bachelorarbeit zeigen konnte. Die zweite Methode ist die Aufreinigung der Reaktionslösung mittels Größenausschlußchromatographie (SEC) über Biogel-P2 mit Wasser

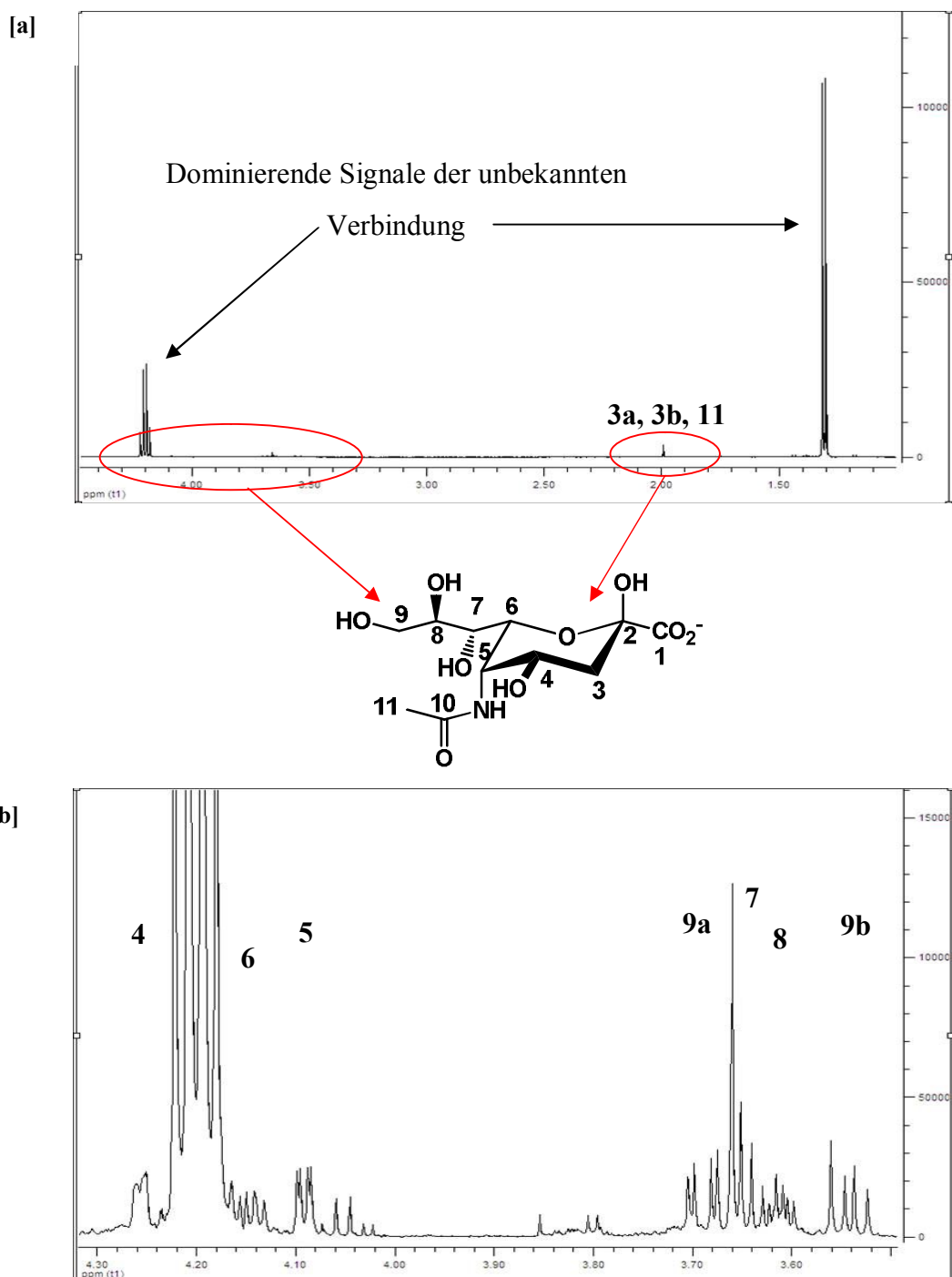
---

als Eluent. Diese Methode ist zwar zeitaufwendiger, birgt aber nicht die Gefahr eines großen Produktverlustes, der weitere Aufreinigungsschritte notwendig macht. Durch den nicht vollständigen Umsatz in der Reaktion waren weitere säulenchromatographische Aufreinigungsschritte notwendig. Um das Produkt von den beiden Edukten abzutrennen, wird zunächst über einen Anionentauscher mittels eines Ameisensäuregradienten aufgereinigt. Dabei wird der nichtgeladene Zucker, der keinerlei Interaktion mit dem Säulenmaterial eingeht, schon beim Nachspülen der Säule mit Wasser eluiert. Durch die stärkere negative Ladung von PEP 1 gegenüber den jeweiligen Neuraminsäurederivaten haftet Ersteres stärker am Säulenmaterial. Zur Elution wird ein diskontinuierlicher Ameisensäuregradient im Konzentrationsbereich von 0-2 M verwendet. Bei Konzentrationen zwischen 0,4-0,6 M eluiert zunächst das gewünschte Produkt, wogegen PEP 1 erst bei einer Gradientenkonzentration von 1,2-1,4 M eluiert wird. Der Nachteil bei diesem Aufreinigungsschritt ist, dass zwar die Edukte effektiv getrennt werden können, aber durch die Verwendung von Ameisensäure im Produkt zusätzlich Formiat eingeschleppt wird. Um dieses abzutrennen und das Produkt in reiner Form zu erhalten, muss das Produkt/Formiatgemisch zusätzlich noch über eine Kationentauschersäule gereinigt werden. Tabelle 3.4 zeigt einen Überblick über die nach der Aufreinigung und Lyophilisieren erhaltenen Ausbeuten an Sialinsäurederivaten für die Synthesen mit der  $\text{PseS}_{Cje}$ . Bei den präparativen Synthesen mit dem NeuB2-Protein konnte trotz mehrerer Versuche, im Gegensatz zu den früheren Testreaktionen, keinerlei Produktbildung erreicht werden. Eine mögliche Erklärung für diese Inaktivität von dem NeuB2-Protein lieferte eine detaillierte Untersuchung und Vergleich der Strukturen der beiden PEP-abhängigen Sialinsäuresynthasen  $\text{PseS}_{Cje}$  und NeuB2 mit der Struktur von NeuS<sub>Nme</sub> (siehe Kapitel 3.4.10).

**Tabelle 3.4:** Präparativen Synthesen mit der Pseudaminsäuresynthase  $\text{PseS}_{Cje}$  nach der säulenchromatographischen Isolierung der Produkte **24** und **25**.

Substrat	Produkt	Ausbeute
10	 <b>24</b>	12 %
18	 <b>25</b>	19 %

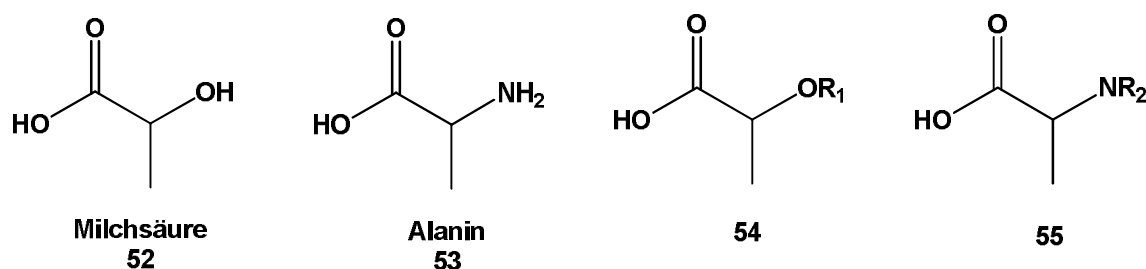
Die Ausbeuten an den entsprechenden Sialinsäurederivaten sind mit 10-20 Prozent sehr unbefriedigend. Durch die Strukturaufklärung mittels 2D-NMR-Spektroskopie konnte zwar bestätigt werden, dass mit der Pseudaminsäuresynthase  $\text{PseS}_{Cje}$  tatsächlich die erwarteten Sialinsäurederivate *5-epi-N-Acetylneuraminsäure* (*5-epi-Neu5Ac*) **24** und *5,7-bisepi-N-Acetylneuraminsäure* (*5,7-bisepi-Neu5Ac*) **25** entstanden sind, jedoch liegt in beiden eine unbekannte Verunreinigung vor, welche mengenmäßig sogar das Hauptprodukt darstellt. (Abb. 3.4).



**Abbildung 3.4:** [a] Original  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum ( $\text{D}_2\text{O}$ , 500 MHz, 300 K) von 5-*epi*-Neu5Ac **24** mit einem unbekannten Nebenprodukt als Hauptprodukt. Das erwartete Produkt **24** ist nur in Spuren vorhanden. [b] Dasselbe Spektrum gespreizt im Bereich 3,5-4,3 ppm, hier finden sich die zum Produkt **24** gehörenden Signale.

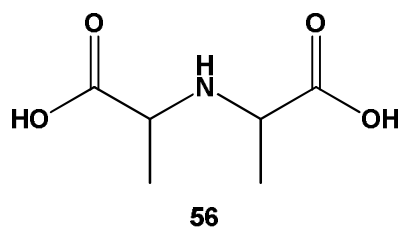
Die beiden zur Verunreinigung gehörenden Signale im  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum, ein Dublett bei  $\delta = 1,3$  ppm und ein Quartett bei  $\delta = 4,2$  ppm zeigen über die gemeinsame Kopplungskonstanten, dass es sich hier um ein Strukturelement der Zusammensetzung

CH<sub>3</sub>CHX<sub>2</sub> handelt. Die chemische Verschiebung des Methinprotons ins Tieffeld indiziert, dass es sich bei der Verunreinigung um eine Heteroatomverbindung handelt, bei der die Methingruppe vermutlich in direkter Nachbarschaft zu einem Sauerstoff- oder Stickstoffatom lokalisiert ist. Da im <sup>13</sup>C-NMR-Spektrum zusätzlich noch ein Signal bei  $\delta = 170$  ppm vorhanden ist, welches nicht zur Carbonsäurefunktionalität der Sialinsäure gehört, ist eine der beiden Nachbargruppen der Methingruppe eine Carbonsäurestruktur (Abb. 3.5).



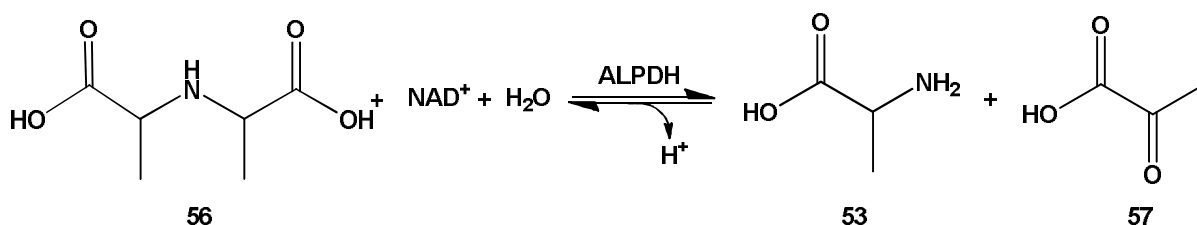
**Abbildung 3.5:** In Frage kommende Strukturen für das bei den präparativen Synthesen unerwünschtem entstandene Hauptprodukt.

Die in Abbildung 3.5 gezeigten Strukturen für Milchsäure **52** und Alanin **53** lassen sich aus dem in D<sub>2</sub>O gemessenen Spektrensatz nicht erklären. Die Signale der Hydroxygruppen und des primären Amins verschwinden in D<sub>2</sub>O durch den dort vorhandenen schnellen Protonenaustausch. Deshalb wurde eine weitere NMR-spektroskopische Untersuchung in DMSO-*d*<sub>6</sub> als Lösungsmittel durchgeführt. In diesem Spektrensatz konnten keine Signale identifiziert werden, die für die Hydroxygruppe am C2-Atom in **52** oder für die Anwesenheit eines primären Amins in **53** sprachen. Das Fehlen weiterer Signale in den Spektrensätzen macht eine Identifizierung der möglichen Seitenketten R<sub>1</sub> in der Struktur **54** oder R<sub>2</sub> in der Struktur **55** sehr schwierig. Da die im <sup>13</sup>C-NMR-Spektrum der unerwünschten Verunreinigung zugeordneten Signale im Vergleich zu den Signalen der Sialinsäure die doppelte Intensität aufweisen, was am deutlichsten beim Signal für die Carbonsäurefunktionalität der Verunreinigung bei  $\delta = 170$  ppm wird. Diese Signalintensität legt die Vermutung nahe, dass es sich bei dieser Verunreinigung um ein symmetrisches Molekül, eine *meso*-Verbindung, handelt. Unter Berücksichtigung dieser spektroskopischen Aspekte und, dass in der Reaktionslösung neben der Synthase nur der *N*-acylierte Aminozyucker, PEP und Tris als Puffersubstanz vorliegen, handelt es sich bei der Verunreinigung um *meso*- oder *rac*-*N*-(1-Methoxycarbonyl)-alanin (Abb. 3.6).



**Abbildung 3.6:** Struktur des als Alanopin **56** identifizierten Nebenproduktes in den präparativen Synthesen mit der Pseudaminsäuresynthase  $\text{PseS}_{Cje}$ .

Eine Abtrennung der Verunreinigung **56** im Rahmen der Aufreinigung der präparativen enzymatischen Synthesen gestaltete sich schwierig. Versuche mit unterschiedlichen säulenchromatographischen Methoden lieferten keine zufriedenstellenden Ergebnisse. Um dieses Problem zu lösen, wurde der Schwerpunkt auf die Identifizierung des Ursprungs dieser Verunreinigung gelegt. Da eine Reinheitskontrolle aller an der Reaktion beteiligten Verbindungen mittels  $^1\text{H}$ -NMR keinen Hinweis auf die Verunreinigung lieferte, musste diese während der enzymatischen Reaktion entstanden sein. Das *meso*-*N*-(1-Methoxycarbonyl)-alanin **56** ist eines der natürlichen Substrate der Alanopindehydrogenase (AlpDH, EC 1.5.1.17)<sup>[108-109]</sup> (Schema 3.16). Dieses, zur Klasse der Oxidoreduktasen gehörende, NADH-abhängige Enzym katalysiert die Gleichgewichtsreaktion zwischen *meso*-*N*-(1-Methoxycarbonyl)-alanin **56**,  $\text{NAD}^+$  und Wasser zu L-Alanin und Pyruvat. In der Rückreaktion kann L-Alanin durch verschiedene andere Aminosäuren ersetzt werden, wie L-Cystein, L-Serin oder L-Threonin. Die Alanopindehydrogenase findet man hauptsächlich in Weichtieren wie *Chlamys farreri nipponensis* oder *Octopus vulgaris*<sup>[109]</sup> oder in anaeroben Bakterien wie *Providencia alcalifaciens* und *Proteus vulgaris* als Bestandteil der Lipooligosaccharide.<sup>[110]</sup> In *Escherichia coli* findet sich jedoch keinerlei identische oder ähnliche Gensequenz für eine Alanopindehydrogenase, daher muss die Bildung von *meso*-*N*-(1-Methoxycarbonyl)-alanin **56** einen anderen Ursprung haben.



**Schema 3.16:** Von der NADH-abhängigen Oxidoreduktase Alanopindehydrogenase (AlpDH) katalysierte Gleichgewichtsreaktion. In der Rückreaktion kann L-Alanin **53** durch verschieden andere Aminosäuren ersetzt werden.

---

Die beiden Synthesen wurden, bevor sie in die präparativen Synthesen eingesetzt wurden, noch über Ionenaustauschchromatographie gegen einen NaCl-Gradienten aufgereinigt und sollten keine Spuren mehr von L-Alanin enthalten, welches durch den Zellaufschluß in den Rohextrakt gelangt sein könnte. Da in den Ansätzen der Synthesen kein NADH vorhanden war, wurden nähere Kontrollversuche mit dem Tris-Puffersystem, Phosphoenolpyruvat und der Synthase  $\text{PseS}_{Cje}$  in Abwesenheit der Zuckerkomponente durchgeführt. Tris ist die einzige Komponente in diesem System, die eine freie Aminogruppe besitzt. Phosphoenolpyruvat unterliegt in wässrigem Milieu einer geringen Hintergrundhydrolyse zu Pyruvat, könnte aber auch selbst an der Bildung des Nebenproduktes beteiligt sein. Die Pseudaminsäuresynthase  $\text{PseS}_{Cje}$  wurde für diese Versuche sowohl als Rohextrakt als auch in aufgereinigter Form eingesetzt.

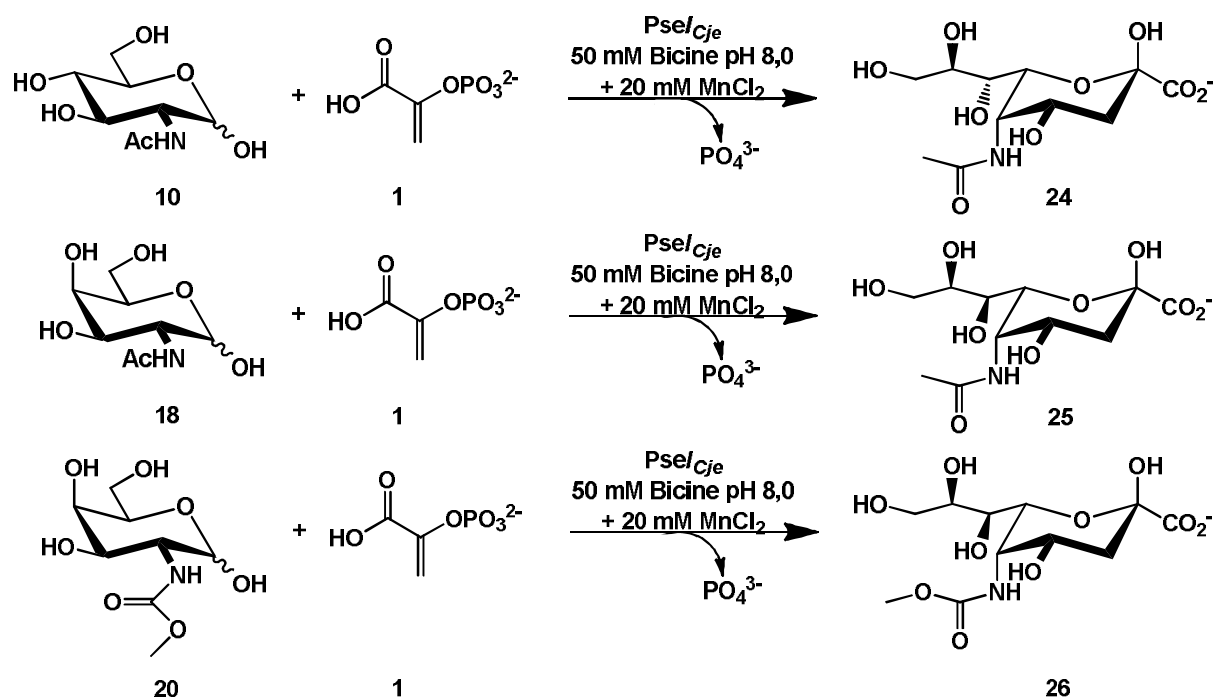
Die Ergebnisse dieser Kontrollen zeigten, dass das Nebenprodukt aus einer Interaktion zwischen Phosphoenolpyruvat **2** und Tris entsteht. Im Rohextrakt kann die Bildung noch mit der Anwesenheit von Resten an L-Alanin und NADH begründet werden. Durch die säulenchromatographische Aufreinigung der Synthase werden diese Komponenten separiert, in den Testreaktionen kam es jedoch trotzdem weiter zur Bildung des Nebenproduktes.

Um in zukünftigen Synthesen dieses Problem zu umgehen, wurde ein Pufferwechsel vollzogen. Getestet wurden dazu verschiedene Puffersysteme wie 50 mM Phosphat-Puffer pH 7.4, Triethanolamin und 50 mM Bicin pH 8,0. Mit letzterem wurden in den Testversuchen die besten Resultate erhalten. Im Folgenden wurde daher 50 mM Bicin pH 8,0 als Puffersystem ausgewählt, da sich hier im Gegensatz zum Phosphat-Puffer die Problematik der Fällung von dem für die katalytische Aktivität der Synthase notwendigen  $\text{Mn}^{2+}$  nicht stellt. Ausserdem wurden die  $\text{PseS}_{Cje}$  und das NeuB2-Protein für eine schnellere und effektivere Aufreinigung über Nickelsepharosesäulen mit einem terminalen  $\text{His}_{6-10}$ -Tag ausgestattet. Mit einem C-terminalen  $\text{His}_{(6-10)}$ -Tag zeigten jedoch beide, mit einem N-terminalen  $\text{His}_{(6-10)}$ -Tag auch das NeuB2-Protein in den Testreaktionen keine Aktivität mehr. Auf den zur Reaktionskontrolle durchgeführten Dünnschichtchromatogrammen konnte auch nach sehr langer Reaktionszeit keine Produktbildung detektiert werden. Nur die  $\text{PseS}_{Cje}$  mit einem N-terminalen  $\text{His}_{(6-10)}$ -Tag zeigte weiterhin die erwartete Aktivität. Durch den Vergleich der simulierten Kristallstrukturen von  $\text{PseS}_{Cje}$  und dem NeuB2-Protein mit der realen Kristallstruktur von NeuS<sub>Nme</sub> (PDB-Code 1XUZ) zeigte sich deutlich, dass der Grund für den Aktivitätsverlust der  $\text{PseS}_{Cje}$  am zusätzlich eingeführten C-terminalen  $\text{His}_{(6-10)}$ -Tag liegt. Die simulierte Struktur der  $\text{PseS}_{Cje}$  ist mit der Kristallstruktur von NeuS<sub>Nme</sub> nahezu identisch (Kap. 3.4.10; Abb. 3.48). Die beiden monomeren Untereinheiten sind um 180° zueinander verdreht



und damit verdeckt das zusätzlich eingeführte C-terminale His<sub>(6-10)</sub>-Tag der einen Monomereinheit den Eingang zur *active-site* der gegenüberliegenden zweiten Monomereinheit und verhindert somit den Eintritt der Substrate.

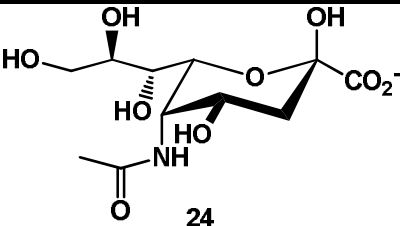
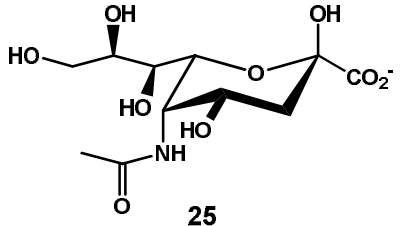
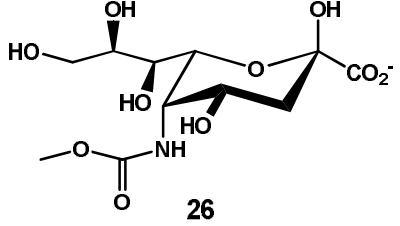
Die in den ersten Testansätzen mit dem NeuB2-Protein für *N*-Acetylgalactosamin **18** und *N*-Acetylglucosamin **10** detektierte Produktbildung, konnte mit einer neuen Charge NeuB2-Protein nicht reproduziert werden. Um die Ursache für die Inaktivität des NeuB2-Proteins zu untersuchen, wurde dessen simulierte Struktur mit der Kristallstruktur von NeuS<sub>Nme</sub> (PDB-Code 1XUZ) verglichen. Dabei zeigten sich in der Struktur des NeuB2-Proteins größere Unterschiede zur Kristallstruktur von NeuS<sub>Nme</sub>, die erklären warum das NeuB2-Protein inaktiv gegenüber diesen Substraten war (Kap. 3.4.10; Abb. 3.41). Auf diesen Resultaten basierend wurde im Weiteren für die präparativen Synthesen der *N*-Acetylneuraminsäureepimeren *5-epi*-Neu5Ac **24**, *5,7-bisepi*-Neu5Ac **25** und des *5-epi*-Neu5Methoxycarbonyl **26** nur noch die mit einem *N*-terminalen His<sub>(6-10)</sub>-Tag versehene Pseudaminsäuresynthase PseS<sub>Cje</sub> eingesetzt.



**Schema 3.17:** Präparative Synthesen mit der Pseudaminsäuresynthase PseS<sub>Cje</sub>.

An der Aufarbeitung der jeweiligen Reaktionslösungen wurde nichts verändert. Nach der doppelten säulenchromatographischen Aufreinigung wurde das isolierte Produkt lyophilisiert und die Struktur mittels 2D-NMR-Spektroskopie verifiziert (Tabelle 3.5).

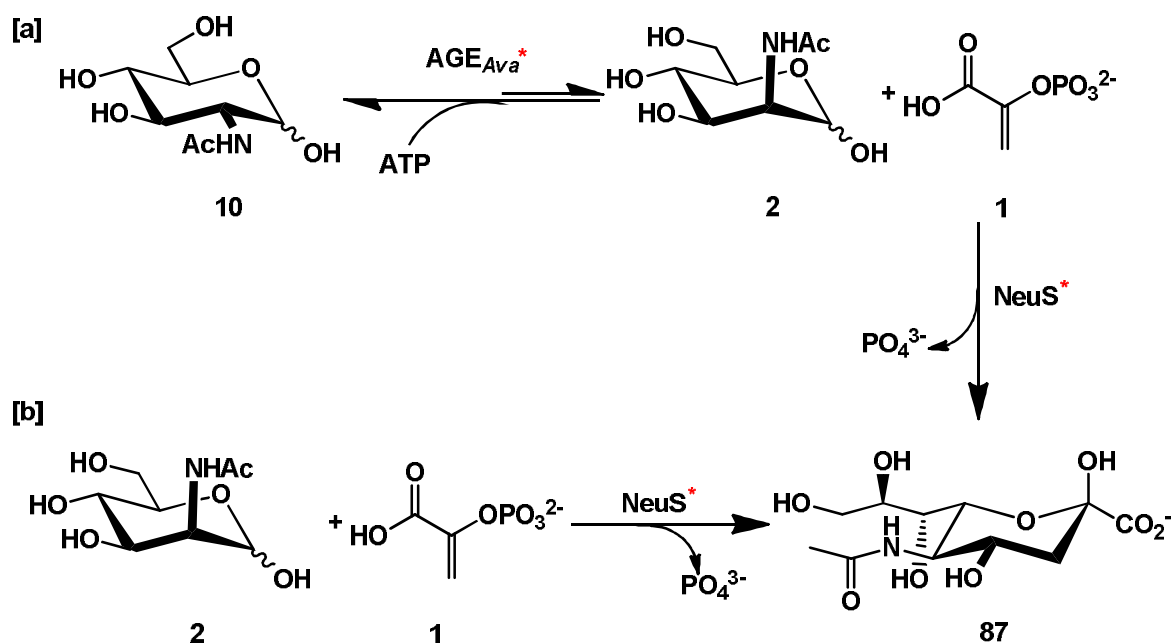
**Tabelle 3.5:** Die mit der Pseudaminsäuresynthase  $\text{PseS}_{Cje}$  aus den Edukten **10**, **18** und **20** erhaltenen Produkte.

Substrat	Produkt	Ausbeute
<b>10</b>	 <b>24</b>	94 mg (12%)
<b>18</b>	 <b>25</b>	62 mg (8.2%)
<b>20</b>	 <b>26</b>	27 mg (7.7%)

### 3.2.1.2 Präparative Synthesen mit den *N*-Acetylneuraminsäuresynthasen $\text{NeuS}_{Nme}$ und $\text{NeuS}_{Cje}$

Die *N*-Acetylneuraminsäuresynthasen  $\text{NeuS}_{Nme}$  und  $\text{NeuS}_{Cje}$  wurden zur präparativen Synthese von *N*-Acetylneuraminsäurederivaten eingesetzt, wobei zwei verschiedene Varianten getestet wurden:

- 1) Ein 1-Enzymsystem mit den Synthasen. Für die Synthese der *N*-Acetylneuraminsäurederivate wurden neben PEP **1** als Edukt die entsprechenden Mannosaminderivate eingesetzt (Schema 3.18 b).
- 2) Ein 1-Topf-2-Enzymsystem, der eigentlichen Synthese mit den Synthasen wurde hier noch eine Epimerisierung, katalysiert von der *N*-Acetylglucosamin-2-Epimerase ( $\text{AGE}_{Ava}$ ), vorgeschaltet (Schema 3.18 a).



**Schema 3.18:** Synthesewege mit den *N*-Acetylneuraminsäuresynthasen  $NeuS_{Nme}$  und  $NeuS_{Cje}$  am Beispiel des natürlichen Substrates **[a]** im gekoppelten System mit der von der *N*-Acetylglucosamin-2-Epimerase  $AGE_{Ava}$  katalysierten, vorgeschalteten Epimerisierungsreaktion; **[b]** als 1-Enzymesystem. (\* Puffer war 50 mM Bicin pH 8,0 mit 10 mM  $MnCl_2$ ).

Die Variante des gekoppelten 1-Topf-2-Enzymsystems (Schema 3.18 [a]) wurde von Jäger im Rahmen seiner Bachelorarbeit detaillierter untersucht.<sup>[83]</sup> Dieses gekoppelte System bietet von der Theorie her die Möglichkeit, einen einfachen Zugang zu neuen interessanten Sialinsäurederivaten ausgehend von billigen und leicht verfügbaren Edukten zu schaffen<sup>[111-112]</sup> und in Kombination mit weiteren enzymkatalysierten Schritten die Möglichkeit für einen kontinuierlichen gekoppelten Enzymassay für kinetische Studien. Der Fokus seiner Untersuchungen lag darauf, das Reaktionssystem möglichst einfach zu gestalten, um die Anzahl der Einflußvariablen bei präparativen Synthesen zu minimieren. Jäger<sup>[83]</sup> hatte hierfür zum Einen untersucht, welches Nukleotid (ATP, ADP und AMP) in welcher Konzentration als allosterischer Aktivator<sup>[113]</sup> für die *N*-Acetylglucosamin-2-Epimerase aus *Anabaena variabilis* ATCC 29413 ( $AGE_{Ava}$ )<sup>[114-116]</sup> am Besten fungiert. Das daran gekoppelte weitere Enzymesystem mit der *N*-Acetylneuraminsäuresynthase hatte er im Bezug auf das geeignetste zweiwertige Metallkation ( $Mg^{2+}$  oder  $Mn^{2+}$ )<sup>[46, 70]</sup> und dessen Konzentration optimiert, was für die Aktivität der Synthase unabdingbar ist. Desweiteren untersuchte er auch noch die für die jeweilige Reaktion minimal notwendige Menge an Enzymen. Diese Untersuchungen wurden in kleinen, eher qualitativen Ansätzen durchgeführt mit *N*-Acetylglucosamin **10** als Substrat und wurden mittels Dünnschichtchromatographie verfolgt. Bei der Wahl des Puffers (50 mM

Bicin pH 8,0) für dieses System wurde auf die Ergebnisse der Bachelorarbeit von *Hippler*<sup>[117]</sup> zurückgegriffen, die sich unter anderem mit der Suche nach dem optimalen Puffersystem befasst hatte.

Die Studien zum geeigneten Nukleotid für die AGE<sub>Ava</sub> korrespondierten mit den aus der Literatur bereits bekannten Daten.<sup>[113]</sup> ATP ist im Vergleich zu ADP der für die Aktivität am besten geeignete Aktivator während AMP keinen Aktivator darstellt.<sup>[111]</sup>

In der Literatur ist die Konzentration an ATP für eine maximale Aktivität der AGE<sub>Ava</sub> mit 25 µM beschrieben<sup>[83]</sup>, was jedoch nur für die Epimerisierungsreaktion im nicht-gekoppelten System gilt. Aus diesem Grund wurden weitere Testreaktionen in einem Konzentrationsbereich von 0,1-0,75 mM ATP im gekoppelten System durchgeführt. Bis zu einer minimalen Konzentration von 0,25 mM ATP konnte nach etwa zwei Tagen noch vollständiger Umsatz erreicht werden.

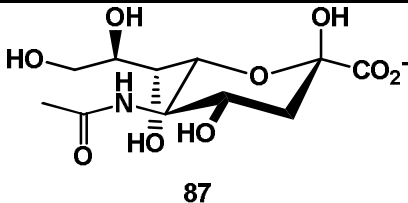
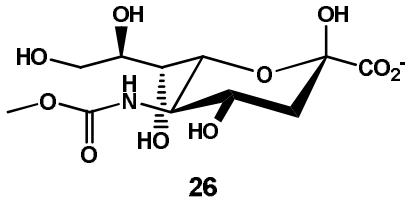
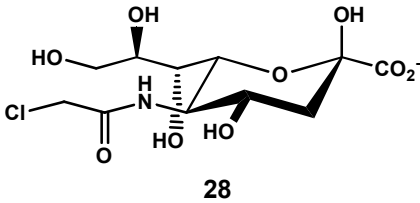
Aktivitätsstudien mit der *N*-Acetylneuraminsäuresynthase NeuS<sub>Nme</sub> und diversen zweiwertigen Metallkationen wurden unter anderem von *Hao* durchgeführt.<sup>[54]</sup> Hierbei stellte sich Co<sup>2+</sup> als bester Cofaktor für die Synthasen heraus, wegen dessen Toxizität im Vergleich zu Mg<sup>2+</sup> und Mn<sup>2+</sup> wurden jedoch nur die letzten beiden für die Untersuchungen verwendet. Alle Ergebnisse dieser Versuche sind in Tabelle 3.6 tabellarisch zusammengefasst.

**Tabelle 3.6:** Überblick über die besten Reaktionsbedingungen aus den Optimierungsstudien des gekoppelten Enzym-Systems.

	NeuS <sub>Nme</sub>	NeuS <sub>Cje</sub>
ATP	0,25 mM	0,25 mM
MnCl <sub>2</sub>	0,1 mM	0,5 mM
MgCl <sub>2</sub>	40 mM	25 mM
AGE <sub>Ava</sub>	6 µl/ml	6 µl/ml
Synthase	0,01 mg/ml	0,02 mg/ml

Basierend auf diesen Ergebnissen führte *Jäger* auch präparative Synthesen mit diesem gekoppelten Enzymsystem sowohl mit NeuS<sub>Nme</sub>, als auch mit der NeuS<sub>Cje</sub> durch. Als Edukte wurden neben *N*-Acetylglucosamin **10** auch zwei weitere *N*-modifizierte Glucosaminderivate *N*-Methoxycarbonylglucosamin **13** und *N*-Chloracetylglucosamin **15** eingesetzt. Die Ergebnisse diese Synthesen sind in Tabelle 3.7 aufgeführt.

**Tabelle 3.7:** Ergebnisse der präparativen Synthesen mit dem gekoppelten System.

Substrat	Produkt	Ausbeute	
2	 87	[a]	[a]
13	 26	70 mg (12%) <sup>[b]</sup>	115 mg (20%) <sup>[c]</sup>
15	 28	254 mg (33%) <sup>[b]</sup>	220 mg (29 %) <sup>[c]</sup>

<sup>[a]</sup> keine Produktisolierung, da diese Synthese nur als Positivkontrolle im kleinen Maßstab diente. <sup>[b]</sup> Ausbeuten aus den Synthesen mit der NeuS<sub>Nme</sub>. <sup>[c]</sup> Ausbeuten aus den Synthesen mit der NeuS<sub>Cje</sub>.

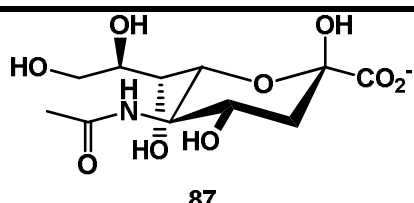
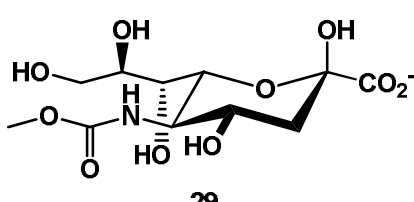
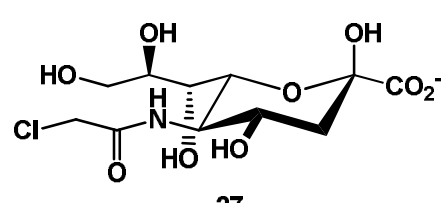
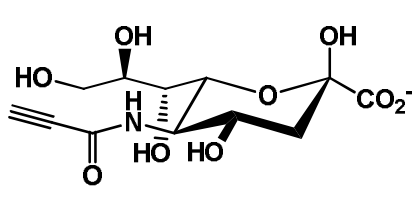
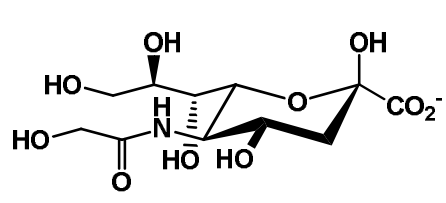
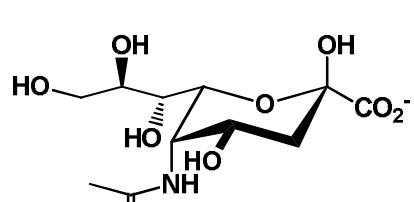
Mit den Ergebnissen aus der Bachelorarbeit von *Jäger* hatte man die Basis für eine effektive Synthese von neuartigen Sialinsäurederivaten durch ein gekoppeltes Mehrenzzymsystem.

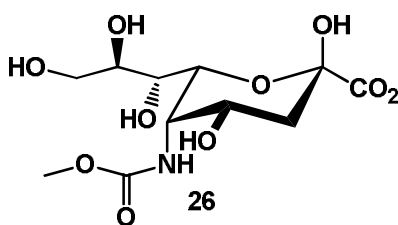
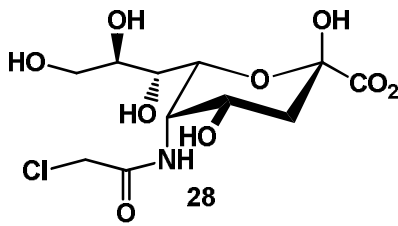
Im Rahmen der Entwicklung eines gekoppelten kontinuierlichen Enzymassays zur kinetischen Untersuchung der Substrattoleranz der beteiligten Enzyme (Kapitel 3.4) zeigte sich jedoch, dass dieses System so nicht geeignet ist, da gleichzeitig zwei Enzyme um die als Substrat eingesetzten *N*-modifizierten Glucosaminderivate (Abb. 3.18 [a]) konkurrieren. Sowohl NeuS<sub>Nme</sub> als auch NeuS<sub>Cje</sub> zeigen auch gegenüber den *gluco*-konfigurierten Derivaten eine gute Aktivität. Um die Ergebnisse aus der Entwicklung des kontinuierlichen Assays zu validieren, wurden die beiden *N*-modifizierten Glucosaminderivate *N*-Methoxycarbonylglucosamin **13** und *N*-Chloracetylglucosamin **15** auch zur präparativen Synthese im 1-Enzymsystem mit den beiden *N*-Acetylneuraminsäuresynthasen NeuS<sub>Nme</sub> und NeuS<sub>Cje</sub> eingesetzt.

Die Synthesen entsprechend des Reaktionspfades in Abb. 3.18 [b] wurden analog zu denjenigen mit der Pseudaminsäuresynthase PseS<sub>Cje</sub> durchgeführt (Schema 3.17). Beide Synthasen NeuS<sub>Nme</sub> und NeuS<sub>Cje</sub> waren ebenfalls für eine effektivere und schnellere Aufreinigung mit einem *N*-terminalen His<sub>(6-10)</sub>-Tag versehen. Die Produkte wurden über eine

zweifache Ionenaustauschchromatographie aufgereinigt. Tabelle 3.8 fasst die Ergebnisse der Synthesen zusammen.

**Tabelle 3.8:** Ergebnisse der Synthesen mit den *N*-Acetylneuraminsäuresynthasen NeuS<sub>Nme</sub> und NeuS<sub>Cje</sub>.

Edukt	Produkt	Ausbeute	
		NeuS <sub>Nme</sub>	NeuS <sub>Cje</sub>
2	 87	quant.	quant.
5	 29	24 mg (11.7%)	++ <sup>[a]</sup>
6	 27	38 mg (14.2%)	++ <sup>[a]</sup>
7	 92	+ <sup>[a]</sup>	+ <sup>[a]</sup>
9	 30	23 mg (11%)	— <sup>[b]</sup>
10	 24	++ <sup>[a]</sup>	18 mg (9%)

13		+ <sup>[a]</sup>	10 mg (4%)
15		+ <sup>[a]</sup>	+ <sup>[a]</sup>

<sup>[a]</sup> Produkt wurde nicht isoliert aufgrund kleiner Ansatzgrößen (limitierende Faktoren wie Verfügbarkeit der Reaktanden) oder zu geringer Produktbildung; <sup>[b]</sup> keine präparative/semipräparative Synthese mit NeuS<sub>Cje</sub> zu wenig Edukt **9**. ++ = mäßiger Umsatz; + = schlechter Umsatz nach 1h.

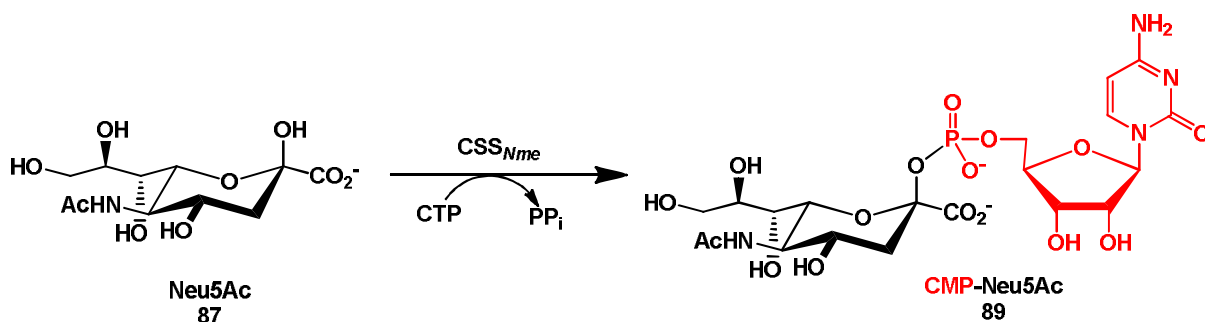
Ausgehend von den beiden Edukten *N*-Methoxycarbonylmannosamin **5** und *N*-Chloracetylmannosamin **6** hatte Jäger<sup>[83]</sup> bereits präparative Synthesen im kleinen Maßstab mit der *N*-Acetylneuraminsäuresynthase NeuS<sub>Nme</sub> durchgeführt. Die jeweiligen Produkte aus den Synthesen wurden in reiner Form isoliert. Die *N*-Acetylneuraminsäuresynthase NeuS<sub>Nme</sub> akzeptiert beide Edukte als Substrate, wie es aus den Ergebnissen der kinetischen Studien erwartet wurde. Im Vergleich zum natürlichen Substrat verlaufen diese Reaktionen jedoch langsamer und es konnte kein vollständiger Umsatz erreicht werden. Im Rahmen ihrer Bachelorarbeit hatte Vethaseelan<sup>[118]</sup> zunächst das *N*-Glykolylmannosamin **9** synthetisiert und dieses im nächsten Schritt auch zur präparativen Synthese mit NeuS<sub>Nme</sub> eingesetzt. Auch in dieser Synthese konnte das gewünschte Produkt isoliert und charakterisiert werden. Die isolierte Ausbeute war mit 10 % nur gering, was durch Verluste während der Aufreinigung erklärt wurde.

Da sich während der Kinetikstudien andeutete, dass die *N*-Acetylneuraminsäuresynthasen konfiguratív nicht spezifisch für die *manno*-Konfiguration im Substrat sind, wurden im kleinen Maßstab ebenfalls präparative Synthesen mit den entsprechenden *gluco*-konfigurierten Substratanaloga *N*-Acetylglucosamin **10** und *N*-Methoxycarbonylglucosamin **13** unter NeuS<sub>Nme</sub>-Katalyse durchgeführt und die entsprechenden isolierten Produkte über 2D-NMR-Spektroskopie verifiziert.

Wegen der limitierenden Verfügbarkeit der Edukte und der jeweiligen Enzyme, der zum Teil relativ geringen Produktbildung, wurden die in Tabelle 3.8 aufgeführten und mit <sup>[a]</sup> gekennzeichneten Produkte nicht isoliert. Der Nachweis ihrer Bildung erfolgte ausschließlich dünnschichtchromatographisch gegen *N*-Acetylneuraminsäure **87** als Referenz.

### 3.3 Aktivierung und Transfer von Sialinsäurederivaten

Die vorletzte Stufe im Sialinsäuremetabolismus von Säugetieren und pathogenen Mikroorganismen ist die Aktivierung der Sialinsäure durch eine CTP-abhängige Sialinsäuresynthase (CSS) (Schema 3.19).



**Schema 3.19:** Aktivierung von *N*-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac 87) durch die CTP-abhängige Sialatsynthase aus *Neisseria meningitidis* (CSS<sub>Nme</sub>).

In dieser CSS<sub>Nme</sub>-katalysierten Reaktion wird unter Abspaltung eines Protons und Pyrophosphats als Nebenprodukt der Monophosphorylrest von CTP auf die anomere Hydroxygruppe der Sialinsäure transferiert. Als Cofaktor verwendet die CTP-abhängige Sialatsynthase Mg<sup>2+</sup> und der optimale pH-Wert für die Reaktion liegt bei 8,5.<sup>[42-45]</sup>

Im finalen Schritt wird dieses CMP-aktivierte Donorsubstrat an seinem Zielort auf der Zelloberfläche auf ein, als Akzeptor dienendes, funktionalisiertes Biopolymer, wie zum Beispiel Glykane, übertragen.<sup>[119-120]</sup> Von diesen Zelloberflächenmolekülen werden eine Vielzahl von biologischen Prozessen geregelt, dazu gehören unter anderem das Zellwachstum<sup>[121]</sup> und die Differenzierung<sup>[121-122]</sup>, oder die Kommunikation zwischen Zellen.<sup>[122]</sup> Da eine der Hauptkomponenten auf der Zelloberfläche Sialinsäuren darstellen, sind diese an vielen physiologischen aber auch pathogenen Prozessen beteiligt.<sup>[123-124]</sup> Der Sialyierungsgrad der Zelloberfläche ist je nach Organismus verschieden und kann extrem hoch sein. Zur Visualisierung solcher Prozesse sind in den letzten Jahren fluoreszenzmarkierte Sialinsäuren in den Fokus der Forschung gerückt. Durch die Verwendung dieser Sialokonjugate lassen sich biologische Prozesse<sup>[119]</sup>, wie Zell-Zell-Adhäsion oder Entzündungsprozesse, sehr sensitiv je nach Art des verwendeten Fluoreszenzmarkers, visualisieren.

Für die Bildung von fluoreszenzmarkierten Zelloberflächen stehen verschieden biochemische Methoden zur Verfügung, bei denen zunächst die Metabolisierung von Substratanaloga erfolgt und anschließend eine chemische Verknüpfung des Fluoreszenzmarkers mit der

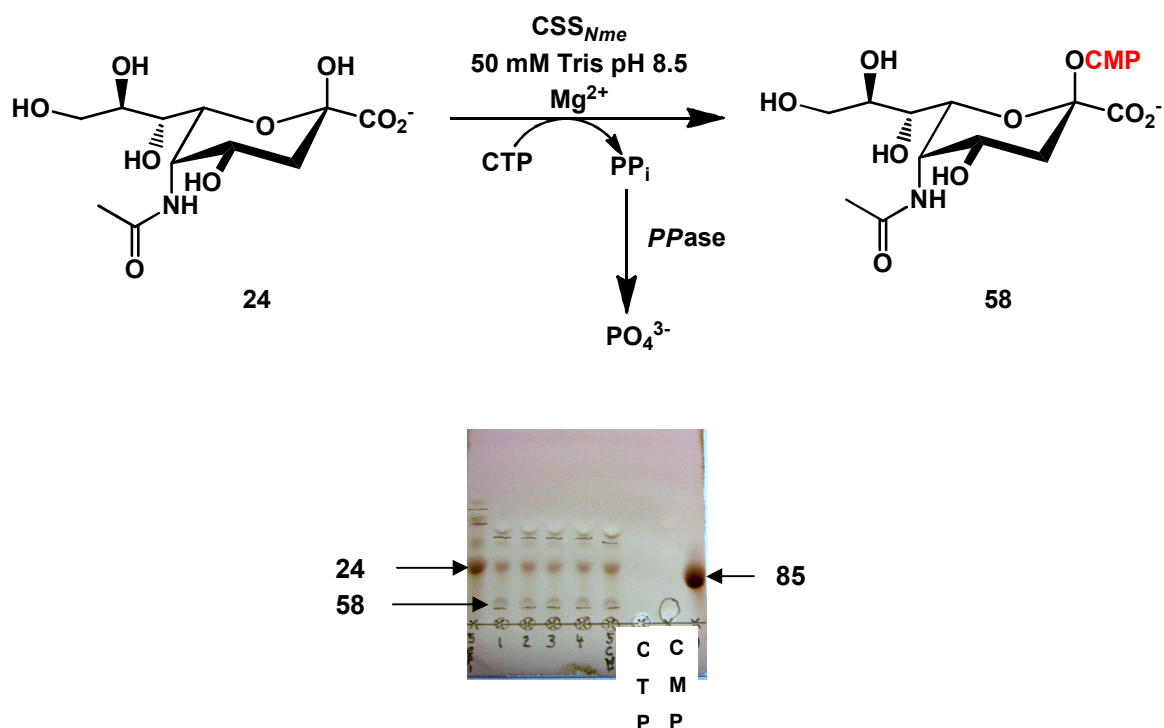


---

Zelloberfläche, diese Veknüpung geschieht meist über Staudinger-Ligation<sup>[125-127]</sup> oder durch kupfer-freie 1,3-dipolare Cycloaddition.<sup>[100]</sup> Für sialylierte Glykane besteht zusätzlich die Möglichkeit der enzymatischen Bildung von fluoreszenzmarkierten Zelloberflächen durch die Verwendung von Sialyltransferasen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden, die aus den präparativen, enzymatischen Synthesen mit der Pseudaminsäuresynthase PseS<sub>Cje</sub>, aus den Edukten *N*-Acetylglucosamin **10** und *N*-Acetylgalactosamin **18**, erhaltenen Sialinsäurederivate, 5-*epi-N*-Acetylneuraminsäure **24** und 5,7-*bisepi-N*-Acetylneuraminsäure **25** für die Aktivierung und den Transfer eingesetzt. Die Synthese wurde auf unterschiedlichen Routen durchgeführt, als Eintopfsynthese und als zweistufige Synthese ohne Isolierung des Zwischenproduktes.

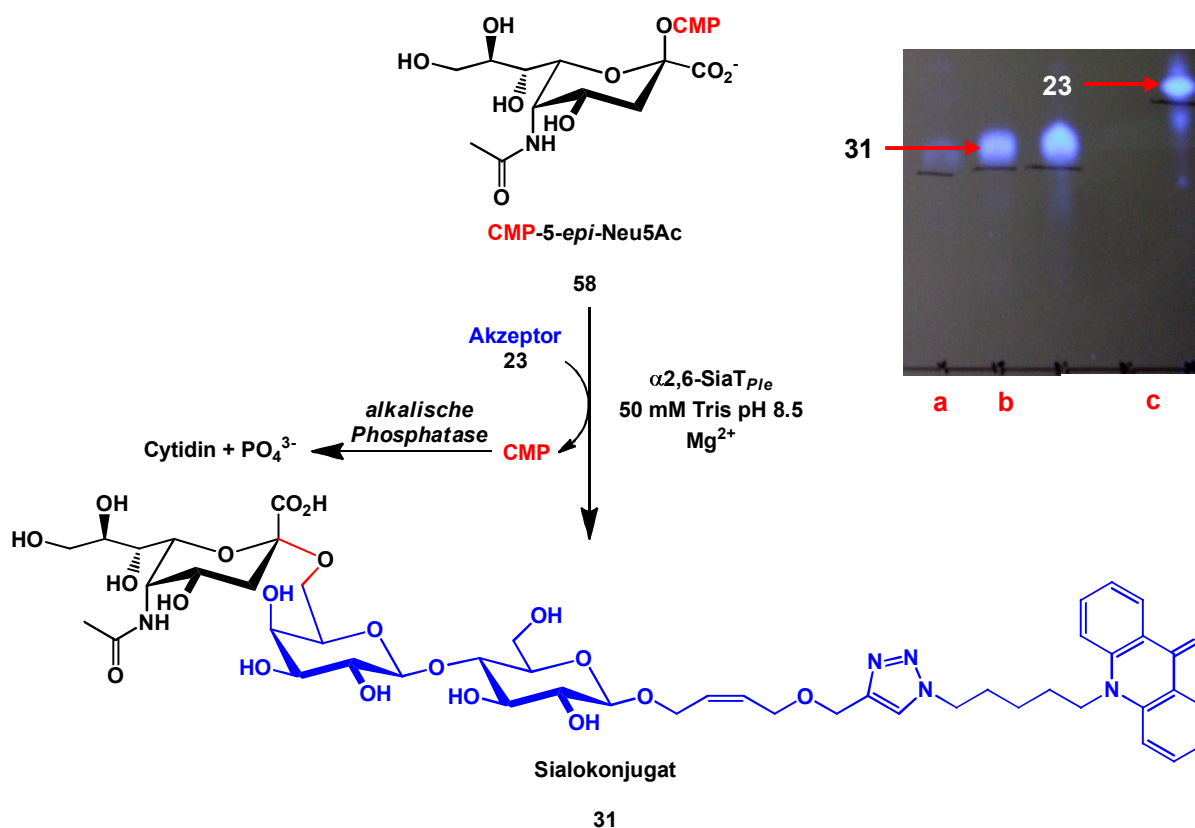
Bei der Planung der Synthesen wurde auf die Erfahrungen von He<sup>[46]</sup> zurückgegriffen, welche im Rahmen ihrer Arbeit detaillierte Untersuchungen der CSS-katalysierten Aktivierungsreaktion mit anschließendem Transfer durchgeführt hatte.<sup>[46]</sup> Für die erste Stufe der Synthese, welche als Zwischenstufe die CMP-aktivierten Sialinsäurederivaten CMP-5-*epi-N*-Acetylneuraminsäure **58** und CMP-5,7-*bisepi-N*-Acetylneuraminsäure **59** lieferte, wurde 50 mM Tris pH 8,5 mit 20 mM MgCl<sub>2</sub> als Puffersystem verwendet (Abb. 3.20).



**Schema 3.20:** Synthese der CMP-aktivierten Sialinsäurederivaten mit der  $\text{CSS}_{Nme}$  am Beispiel von 5-*epi*-N-Acetylneuraminsäure **24**. Das Produkt CMP-5-*epi*-N-Acetylneuraminsäure **58** wurde direkt in die Transferreaktion eingesetzt.

Da es sich bei den Komponenten 5-*epi*-N-Acetylneuraminsäure **24** und 5,7-bis-*epi*-N-Acetylneuraminsäure **25** und dem im zweiten Stufe eingesetzten fluoreszenzmarkierten Lactosylakzeptor **23** um sehr wertvolle Substanzen handelt, wurde der Ansatz so gewählt, dass möglichst ein kompletter Umsatz der CMP-aktivierten Sialinsäurederivate mit dem Akzeptor **23** erreicht werden sollte. Auf ein Äquivalent des Lactosylakzeptors **23** wurden fünf Äquivalente des Sialinsäurederivates in der Aktivierungsreaktion eingesetzt und auf ein Äquivalent Sialinsäurederivat wurden 1,2 Äquivalente CTP verwendet. Die für die Aktivierung benötigte CMP-Sialinsäuresynthase stammte aus *Neisseria meningitidis* ( $\text{CSS}_{Nme}$ ). Das als Nebenprodukt in der Reaktion entstehende Pyrophosphat hat eine inhibitorische Wirkung auf die  $\text{CSS}_{Nme}$ , weshalb es aus der Reaktion entfernt werden muss. Dafür wurde in der Synthese zusätzlich noch eine anorganische Pyrophosphatase (PPase) der Reaktionslösung zugegeben.<sup>[44, 69]</sup> Ein weiterer wichtiger Punkt in der Reaktionsführung war die pH-Kontrolle, da die Stabilität der CMP-aktivierten Sialinsäurederivate nur im basischen Milieu gegeben ist. Sinkt der pH-Wert ins neutrale bis leicht saure ab, setzt die Zersetzung der gebildeten CMP-Zwischenprodukte ein. Das Reaktionsvolumen in den Synthesen betrug 1 ml und die Inkubation erfolgte bei 37°C unter leichtem Schütteln. Der Reaktionsfortschritt wurde mittels

Dünnschichtchromatographie halbstündlich verfolgt. Als Positivkontrolle für die Aktivität der eingesetzten  $CSS_{Nme}$  wurde parallel zusätzlich noch ein Testansatz mit Neu5Ac **87** durchgeführt und als positive Referenz bei der DC-Kontrolle das Produkt CMP-Neu5Ac **89** verwendet. Die Kontrollreaktion mit dem natürlichen Substrat Neu5Ac **87** war nach 30 Minuten fast und nach einer Stunde vollständig abgelaufen. Mit den beiden Sialinsäurederivaten 5-*epi*--*N*-Acetylneuraminsäure **24** und 5,7-*bisepi*--*N*-Acetylneuraminsäure **25** konnte nach einer Stunde erste Spuren von Produktbildung detektiert werden. Da die Reaktionen sehr langsam liefen wurde mehrere Male frische  $CSS_{Nme}$  und PPase nachdosiert. Ein vollständiger Umsatz der Sialinsäurederivate zu den jeweiligen CMP-Zwischenprodukten konnte jedoch auch nach längeren Reaktionszeiten nicht erreicht werden. Die Reaktionslösung wurde daher kurz zentrifugiert um die entstandenen Salze zu entfernen, und der Überstand für den Sialyltransfer als zweite Stufe der Synthese eingesetzt (Schema 3.21).

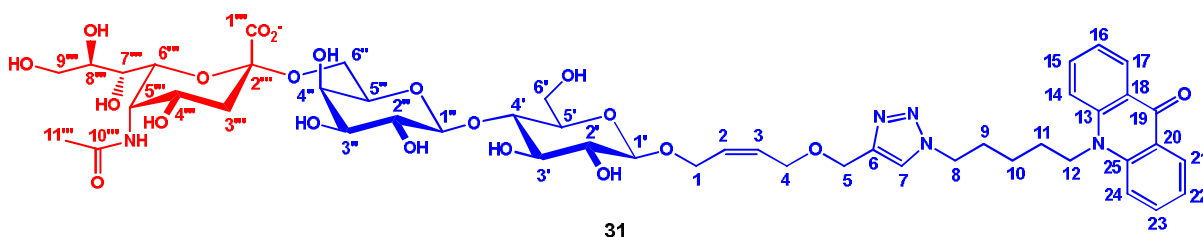


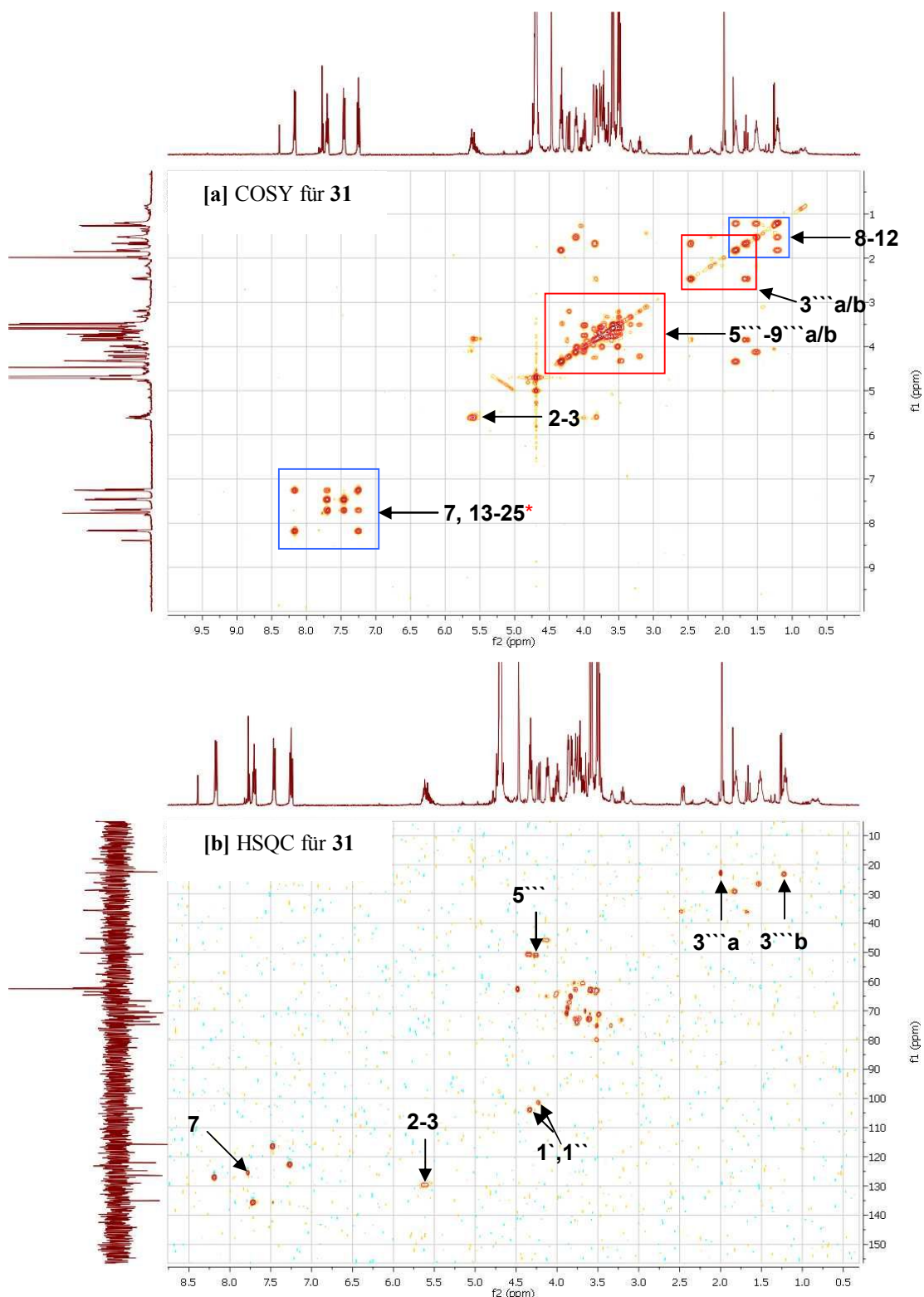
**Schema 3.21:** Enzymatischer Transfer von CMP-5-*epi*-Neu5Ac **58** auf den Acridon-gelabelten Lactosylakzeptor **23** mit der  $\alpha 2,6$ -Sialyltransferase aus *Photobacterium leiognathi* ( $\alpha 2,6$ -SiaT<sub>Ple</sub>). Die Produktisolierung erfolgte über RP<sub>18</sub>-Kieselgel. **a**: Reaktionslösung vor der Aufreinigung; **b**: Isoliertes Produkt **58** nach der Säule; **c**: Lactosylakzeptor **23** als Referenz

Für die Transferreaktion wurde die  $\alpha$ 2,6-SiaT<sub>Plc</sub> eingesetzt, welche die  $\alpha$ -selektive Übertragung der Sialinsäurederivate aus CMP-5-*epi*-N-Acetylneuraminsäure **58** und CMP-5,7-*bisepi*-N-Acetylneuraminsäure **59** auf die C6-Position des terminalen Galactoserestes im fluoreszenzmarkierten Lactosylakzeptor **23** katalysiert.<sup>[48]</sup> Zunächst wurde ein Äquivalent des als Fluoreszenzmarkers eingesetzten Lactosids **23** in 50 mM Tris pH 8,5 mit 20 mM MgCl<sub>2</sub> gelöst und der pH-Wert der Lösung kontrolliert. Danach wurden die  $\alpha$ 2,6-SiaT<sub>Plc</sub> und alkalische Phosphatase als weiteres Hilfsenzym zugegeben. Mit dem Einsatz der alkalischen Phosphatase soll das in dieser Reaktion als Nebenprodukt entstehende und störende CMP zu Cytidin und Phosphat gespalten werden.<sup>[128]</sup> Der Ansatz wurde bei 30°C unter leichtem Schütteln inkubiert und nach erneuter pH-Kontrolle der Überstand aus der Aktivierungsreaktion zugegeben. Die Zugabe erfolgte in Portionen, so dass im Laufe der Reaktion immer wieder frische CMP-aktivierte Sialinsäurederivate verfügbar waren. Die Reaktionskontrolle erfolgte dünnschichtchromatographisch, wobei auf Grund der Fluoreszenzintensität des eingesetzten Lactosids schon geringste Spuren an Produktbildung hochempfindlich bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 366$  nm detektiert werden können.

Da bei der CMP-Aktivierung des Neuraminsäurederivates kein vollständiger Umsatz erzielt werden konnte, wurde die Transferreaktion dann beendet, wenn durch optische Kontrolle auf der DC-Platte keine weitere Zunahme des Produktspots mehr zu erkennen war. Die Reaktionslösung wurde kurz zentrifugiert, um ausgefallene Salze zu entfernen und danach das Produkt durch Bindung an RP<sub>18</sub>-Kieselgel aufgereinigt. Um das gebildete Produkt zu isolieren, wurde mit einem Methanolgradienten zwischen 0-40 Prozent fraktionierend eluiert.

In Abbildung 3.7 sind die für die Verbindung **31** (10-[5-(4-(((Z)-4-O-((5-*epi*-N-Acetyl- $\alpha$ -D-neuraminsäure)-(2 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-lactosyloxy)-but-2-enyloxy)methyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)pentyl]-10*H*-acridon-9-on) entsprechenden COSY- und HSQC-Spektren gezeigt.





**Abbildung 3.7:** 2D-NMR-spektroskopische Strukturaufklärung für **31**. Die wichtigsten Signale zur Strukturaufklärung sind hervorgehoben. \* Im COSY für **31** sind bei 13-25 alle Signale zu finden mit Ausnahme der fünf quartären Kohlenstoffe im Acridon.

Die beiden fluoreszenzgelabelten *N*-Acetylneuraminsäurederivaten **31** und **32** konnten rein isoliert werden, jedoch waren die erhaltenen Gesamtausbeuten mit 10 % relativ niedrig. Der

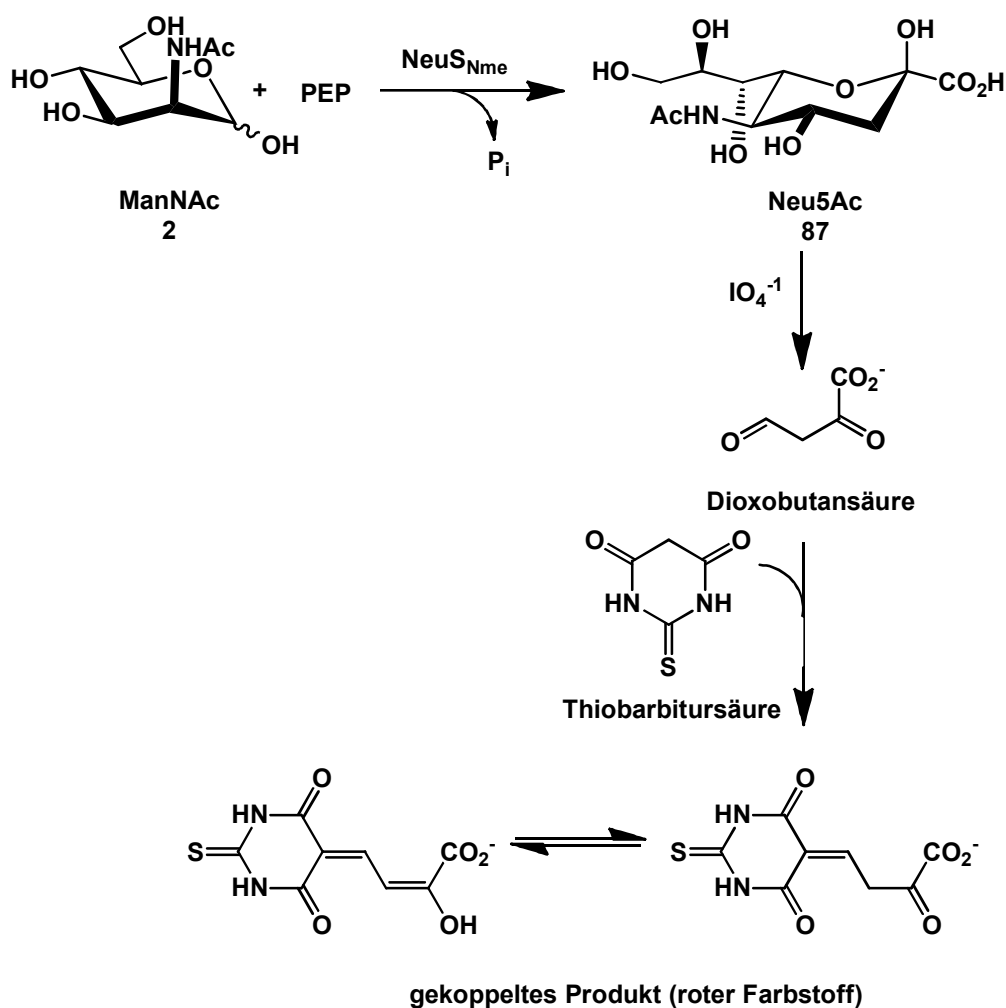
---

Grund für diese sehr niedrige Gesamtausbeute kann darin begründet liegen, dass die beiden in der Aktivierungsreaktion mit der CSS als Substrate eingesetzten Epimere der *N*-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac) nicht mehr richtig in die *active-site* der CSS koordiniert werden können, vor allem aufgrund der konfigurativen Änderung an der C-5 Position. Durch die jetzt andere konfigurative Ausrichtung der Acetamidogruppe in **31** und **32** im Vergleich zur der in **87** ändern sich die sterischen Ansprüche und die Epimere können für eine optimale Umsetzung nicht mehr korrekt positioniert werden. Werden in der Aktivierungsreaktion schon sehr geringe Umsätze erreicht, kann es in der Transferreaktion zu denselben limitierenden Faktoren kommen. Die konfigurativen Änderungen an den Positionen C5 und C5/C7 sorgen auch in der *active-site* der Sialyltransferase durch andere sterische Ansprüche und polare Wechselwirkungen mit Aminosäureseitenketten der *active-site* für eine nicht optimale Substratorientierung für die katalytische Reaktion.

### **3.4 Kinetische Studien mit den PEP-abhängigen Sialinsäuresynthasen**

#### **3.4.1 Bekannte Methoden für die kinetische Untersuchungen von Sialinsäuresynthasen**

In den letzten beiden Dekaden haben sich viele Arbeitsgruppen mit dem Studium von Sialinsäuresynthasen aus verschiedenen pathogenen Mikroorganismen beschäftigt. Die Arbeiten konzentrierten sich vor allem auf mikrobiologische und präparative Untersuchungen.<sup>[58, 73]</sup> Nur wenige Gruppen befassten sich auch mit kinetischen Untersuchungen von Sialinsäuresynthasen. Bei diesen Untersuchungen lag das Hauptaugenmerk allerdings ausschließlich auf der Bestimmung der kinetischen Daten<sup>[55, 58]</sup> für die natürlichen Substrate ManNAc **2** und PEP **1** mittels dem Thiobarbitursäure-(TBA)-Assay<sup>[58, 129-130]</sup> oder dem Phosphat-Assay.<sup>[55, 69]</sup> Beim Thiobarbitursäure-Assay handelt es sich um eine klassische chemische Abbaumethode zur photochemischen Bestimmung von *N*-Acetylneuraminsäure **87** (Schema 3.22).<sup>[129, 131]</sup>

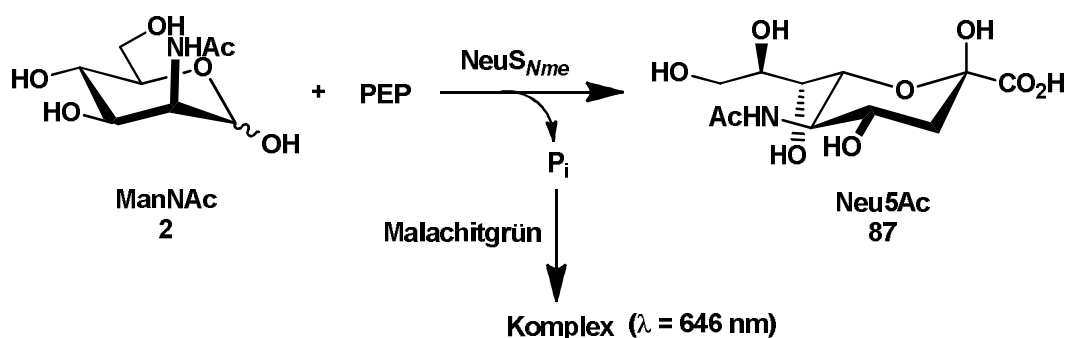


**Schema 3.22:** Ablauf des Thiobarbitursäure-(TBA)-Assay.<sup>[130]</sup> Der aus dem oxidativen Spaltungsprodukt und Thiobarbitursäure entstehende Farbstoff wird in die organische Phase extrahiert und bei  $\lambda = 549 \text{ nm}$  vermessen, um daraus die Konzentration der Sialinsäure **87** zu ermitteln.

Bei dieser Methode handelt es sich um einen diskontinuierlichen Spaltungsassay. Die Sialinsäure Neu5Ac **87** wird mittels Periodat zunächst zur Dioxobutansäure oxidiert. Bei Zugabe von Thiobarbitursäure entsteht als Kreuz-Kondensationsprodukt ein roter Farbstoff. Mit Hilfe eines geeigneten Lösungsmittels, wie Cyclohexanon, wird der Farbstoff extrahiert. Durch den Solvenswechsel wird die rote Farbe des gekoppelten Produktes intensiviert und somit die messbare Extinktion und Selektivität gesteigert. Die in der Probe enthaltene Farbstoff-Konzentration wird photometrisch bestimmt. Die Messung erfolgt bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 549 \text{ nm}$ . Große Nachteile dieser Methode sind eine schlechte Reproduzierbarkeit und eine zur Messung von Anfangsgeschwindigkeiten zu geringe Sensitivität.

Der neben dem Thiobarbitursäure-(TBA)-Assay für kinetischen Studien verwendete Phosphat-Assay macht sich das während der enzymatischen Reaktion stöchiometrisch

entstehende Phosphat zur Quantifizierung der korrespondierenden Neu5Ac-Menge zu nutzen (Schema 3.23).<sup>[80, 132]</sup>



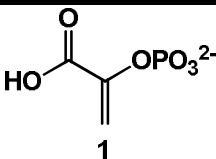
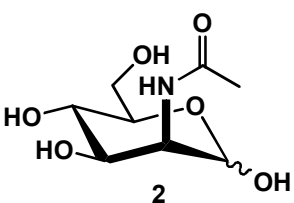
**Schema 3.23:** Ablauf des Phosphat-Assays. Der während der Reaktion aus dem entstandenen Phosphat und dem Farbstoff Malachitgrün entstehende Komplex wird zur Detektion ( $\lambda = 646 \text{ nm}$ ) und Quantifizierung der stöchiometrisch äquivalenten Sialinsäuremenge verwendet.

Das in der Reaktion entstehende Phosphat kann durch Zugabe von Malachitgrün komplexiert werden. Zum Quenchen dieser Farbreaktion gibt man schließlich Citrat-Lösung zu. Die Konzentration des entstandenen Phosphatkomplexes, welche direkt an die Menge der entstandenen Neu5Ac **87** gekoppelt ist, wird photometrisch bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 646 \text{ nm}$  gegen eine Phosphat-Eichgerade bestimmt. Der ebenfalls diskontinuierliche Phosphat-Assay besitzt dieselben Nachteile wie der Thiobarbitursäure-(TBA)-Assay. Beim Phosphat-Assay kommt jedoch zusätzlich noch eine hohe Fehleranfälligkeit hinzu, da schon geringste Spuren an externem Phosphat die Messergebnisse verfälschen. Auch das von NeuS<sub>Nme</sub> für seine katalytische Aktivität benötigte zweiwertige Metallion stört im Phosphat-Assay, da es das entstehende Phosphat bindet und als schwerlösliches Salz aus der Reaktion entfernt.

Die ersten kinetischen Studien mit der *N*-Acetylneuraminsäuresynthase aus *Neisseria meningitidis* (NeuS<sub>Nme</sub>) wurden im Jahre 1962 von der Gruppe von Blacklow et al. durchgeführt. Die Gruppe bestimmte die  $K_M$ -Werte für die natürlichen Substrate der NeuS<sub>Nme</sub> mit dem Thiobarbitursäure-(TBA)-Assay (Tab. 3.9).<sup>[9]</sup>

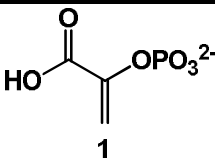
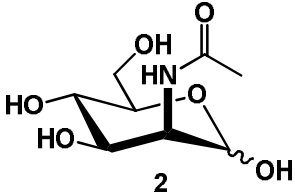
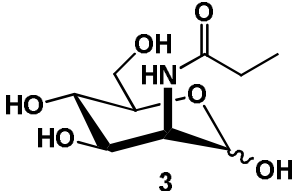
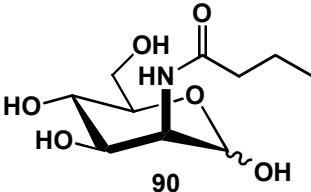
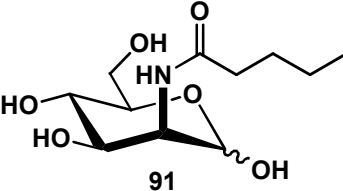


**Tabelle 3.9:** Affinität der *N*-Acetylneuraminsäuresynthase NeuS<sub>Nme</sub> gegenüber ihren beiden natürlichen Substraten *N*-Acetylmannosamin **2** und Phosphoenolpyruvat **1**. Bestimmt mittels TBA-Assay.<sup>[9]</sup>

Substrat	$K_M$ -Wert [mM]
 <p style="text-align: center;"><b>1</b></p>	0.04
 <p style="text-align: center;"><b>2</b></p>	6.3

Die Arbeitsgruppe um *Sundaram* et al. hat kinetische Studien mit der *N*-Acetylneuraminsäuresynthase aus *Campylobacter jejuni* (NeuS<sub>Cje</sub>) durchgeführt, wobei neben den natürlichen Substraten auch die von ihnen synthetisierten *N*-modifizierten Mannosaminderivate vermessen wurden **2**, **3**, **90** und **91** (Tabelle 3.10). Zur Bestimmung der kinetischen Konstanten der verschiedenen Mannosaminderivate verwendete die Gruppe um *Sundaram* et al. ebenfalls den Thiobarbitursäure-(TBA)-Assay.<sup>[58]</sup>

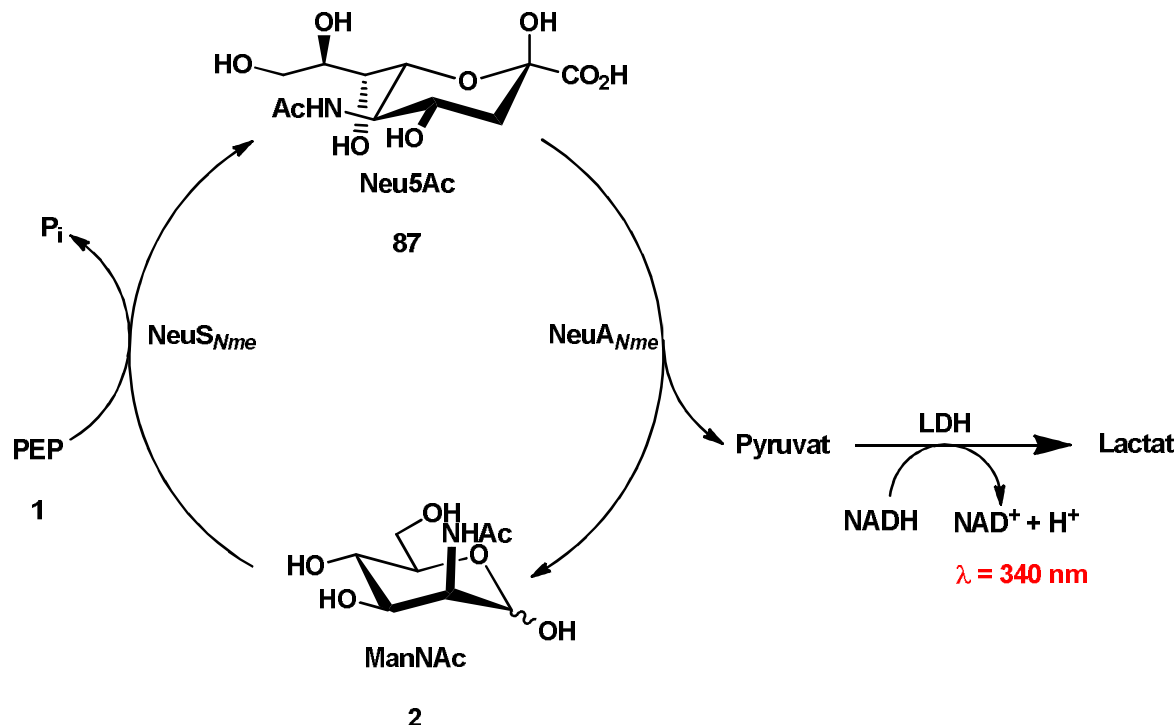
**Tabelle 3.10:** Überblick über die Affinität, Aktivität und katalytische Effizienz der *N*-Acetylneuraminsäuresynthase NeuS<sub>Cje</sub> gegenüber den beiden natürlichen Substraten *N*-Acetylmannosamin **2**, Phosphoenolpyruvat **1** und *N*-modifizierter Mannosaminderivate, ermittelt mit dem Thiobarbitursäure (TBA)-Assay.<sup>[58]</sup>

Substrat	$K_M$ -Wert [mM]	$k_{cat}$ -Wert [min <sup>-1</sup> ]	$k_{cat}/K_M$ -Wert [mM <sup>-1</sup> *min <sup>-1</sup> ]
 1	7.3	19	2.6
 2	17.6	19.9	1.08
 3	5.5	11.8	2.14
 90	15.0	3.5	0.23
 91	31.1	0.8	0.026

### 3.4.2 Entwicklung eines gekoppelten, kontinuierlichen Assays

Um diese Probleme der angesprochenen Assays zu umgehen, wurde im Rahmen dieser Arbeit ein gekoppelter kontinuierlicher Enzym-Assay entwickelt, der schnell eine gute Reproduzierbarkeit bei einer sehr niedrigen Empfindlichkeitsgrenze gewährleistet und sich zusätzlich in einen miniaturisierbaren High-Throughput-Assay umwandeln lässt. Die

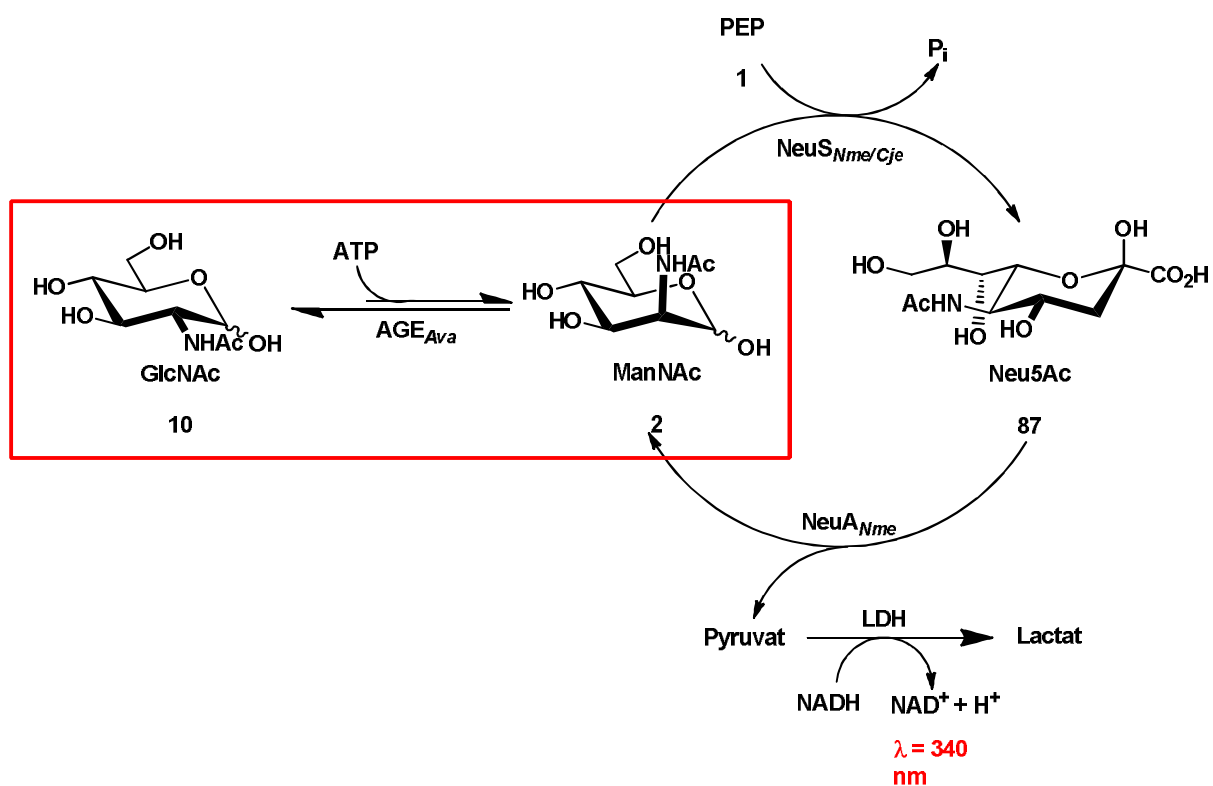
Grundlage in der Theorie für diesen Assay bildete der in unserer Gruppe von *Knorst*<sup>[69]</sup> entwickelte Substrat-Recycling-Assay zur Konzentrationsbestimmung von Sialinsäuren (Schema 3.24). Dieser Assay kombiniert die beiden in ihrer Funktion komplementären Enzyme *N*-Acetylneuraminsäuresynthase  $\text{NeuS}_{Nme}$  und die *N*-Acetylneuraminsäurealdolase  $\text{NeuA}_{Nme}$  so, dass bei Zugabe von Neu5Ac **87** oder ManNAc **2** in das Reaktionssystem eine immer wieder durchlaufene zyklische Reaktion gestartet wird, vorausgesetzt es ist eine ausreichende Menge an PEP **1** vorhanden. Werden die im Substrat-Recycling-Assay beteiligten Enzyme und PEP **1** im Überschuß eingesetzt, ist die Recyclinggeschwindigkeit ausschließlich von der Konzentration an Neu5Ac **87** in der Reaktionslösung abhängig. Mit diesem Assay lassen sich bei entsprechender Limitierung auch alle anderen an diesem System beteiligten Komponenten bestimmen/vermessen. Das während der zyklischen Reaktion entstehende Pyruvat wird mit einer NADH-abhängigen Lactatdehydrogenase irreversibel zu Lactat umgewandelt. Die Abnahme der NADH-Konzentration während der Reaktion, dient als Detektionssystem für die kinetischen Messungen, welche photometrisch bei  $\lambda = 340 \text{ nm}$  verfolgt werden. Aus diesen Messdaten lassen sich über einen Fit an die Michaelis-Menten-Kinetik mit Hilfe geeigneter Programme der  $K_M$ -Wert und  $v_{max}$  für das jeweilig vermessene Substrat ermitteln.



**Schema 3.24:** Von *Knorst* entwickelter Substrat-Recycling-Assay<sup>[69]</sup> zur Bestimmung einer Sialinsäurekonzentration als Basis für den im Rahmen dieser Arbeit entwickelten kontinuierlich gekoppelten Assay für Sialinsäuresynthasen.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte auf der Basis des oben gezeigten Substrat-Recycling-Assay ein erweiterter, gekoppelter, kontinuierlicher Enzym-Assay aufgebaut werden für ein effektives und reproduzierbares Screening der PEP-abhängigen Sialinsäuresynthasen, hinsichtlich ihrer Substrattoleranz und Flexibilität. Ein weiterer wichtiger Aspekt beim Aufbau dieses Assays war, dass er ebenfalls als miniaturisierbarer und automatisierbarer High-Throughput-Assay angewandt werden kann.

Da es sich bei Mannosamin **2** und den Mannosaminderivaten **3-9** um relativ teure Substrate handelt, sollte diesem Enzym-System noch eine weitere enzymatische Reaktion vorgeschaltet werden (Schema 3.25).



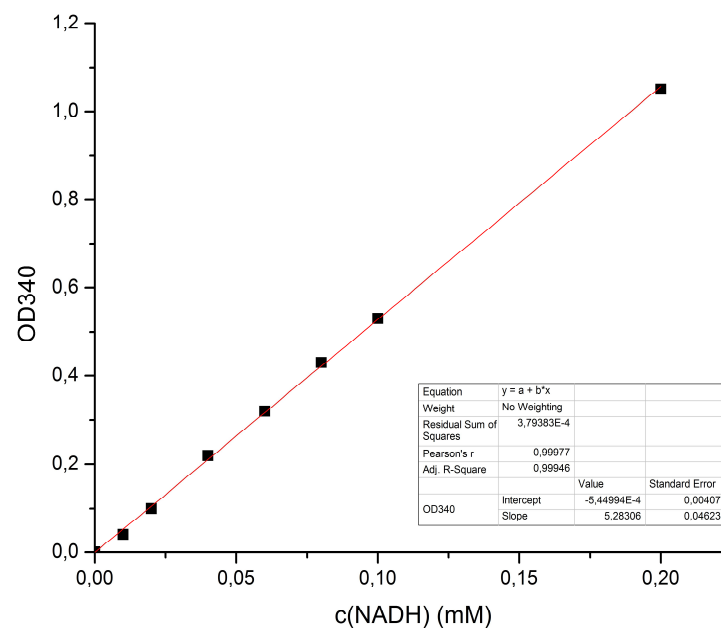
**Schema 3.25:** Gekoppelter, kontinuierlicher Enzym-Assay, bestehend aus dem Recycling-Assay mit vorgeschalteter Epimerisierungsreaktion, katalysiert durch die *N*-Acetylglucosamin-2-Epimerase  $AGE_{Ava}$  (EC 5.1.3.8).

Durch die Verwendung der ATP-abhängigen *N*-Acetylglucosamin-2-epimerase ( $AGE_{Ava}$ , EC 5.1.3.8), welche die Epimerisierung zwischen *N*-Acetylglucosamin **10** und *N*-Acetylmannosamin **2** katalysiert, kann man in Abhängigkeit der Substrattoleranz der Epimerase für präparative Synthesen von Neuraminsäurederivaten von den günstigeren Glucosaminderivaten als Edukte ausgehen.

Das Gleichgewicht der Epimerisierungsreaktion liegt auf Seiten des *N*-Acetylglucosamins **10**<sup>[113]</sup>, was bei der Konzeption des gekoppelten, kontinuierlichen Enzym-Assays beachtet werden muss. Ebenfalls kann man dem Gesamtsystem nicht mehr zwingend eine einfache Michaelis-Menten-Kinetik zu Grunde legen, wie es im modifizierten Recycling-Assay noch eher der Fall ist. Zur Bestimmung der substratspezifischen kinetischen Konstanten der ATP-abhängigen *N*-Acetylglucosamin-2-epimerase muss die Konzentration des *in-situ* gebildeten ManNAc **2** herangezogen werden. Sind die Anfangsgeschwindigkeiten in dem für die Messungen benötigten Konzentrationsbereich noch im linearen Bereich, kann eine Michaelis-Menten-Kinetik angewendet werden, andernfalls müssen komplexere Berechnungsmethoden (Näherungsverfahren) zu Grunde gelegt werden.

Zur Optimierung des Systems musste dieses zunächst Schritt für Schritt rückwärts aufgebaut werden um zu gewährleisten, dass keiner der nachgeschalteten Schritte limitierend ist, sondern nur das zu vermessende Element.

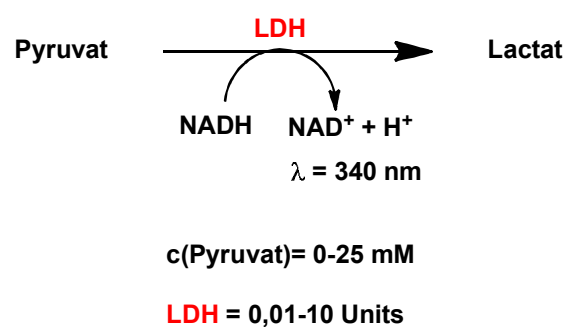
Der erste Schritt war die Aufnahme einer Eichgeraden für die Absorption von NADH bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 340$  nm bei unterschiedlichen NADH-Konzentration im Bereich von 0,00-1,00 mM. Die Steigung dieser Geraden wird bei der Auswertung der Messdatenreihen benötigt (Abbildung 3.8).



**Abbildung 3.8:** Eichgerade von NADH bei unterschiedlichen Konzentrationen zwischen 0,00-0,20 mM aufgenommen bei  $\lambda = 340$  nm. Bei höheren NADH-Konzentration verlässt man schnell den linearen Bereich und kommt in die Sättigung.

Alle für die Optimierung des Assay notwendigen Schritte wurden in Quarzküvetten mit einem festen Gesamtvolumen von 300 µl durchgeführt und am Photometer bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 340 \text{ nm}$  spektroskopisch verfolgt. Für die kinetischen Messungen wurde die Endkonzentration an NADH in der Probe auf 0.25 mM festgesetzt. Als Puffer wurde 50 mM Bicin pH 8.0 mit 10 mM  $\text{MnCl}_2$  verwendet. Um aussagekräftige Messdaten zu bekommen, erfolgte für jede Messreihe eine Dreifachbestimmung gegen eine Negativkontrolle als Blindwert.

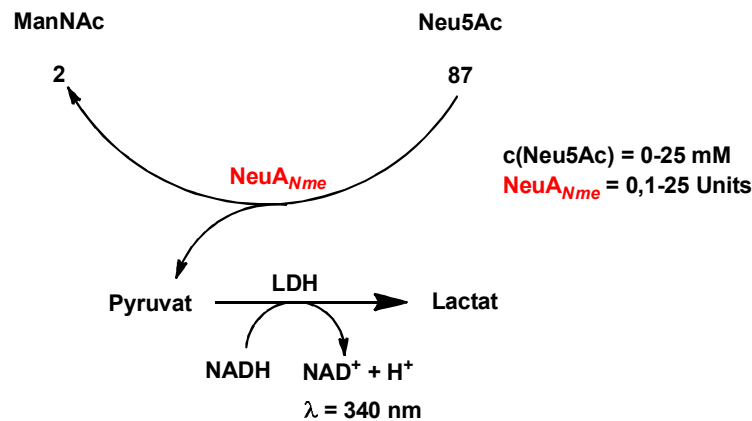
Das Detektionssystem, katalysiert durch die NADH-abhängige Lactatdehydrogenase (LDH), wurde im nächsten Schritt optimiert (Schema 3.26).



**Schema 3.26:** Optimierung des Detektionssystems durch Variation der LDH-Menge und der Pyruvatkonzentration.

In der ersten Messreihe wurde bei einer festen Pyruvatkonzentration von 5 mM die Menge der NADH-abhängigen Lactatdehydrogenase (LDH) zwischen 0,01 und zehn Units variiert. Als Negativkontrolle diente eine Probe ohne Pyruvat. In zwei weiteren Messreihen wurde die Pyruvatkonzentration zwischen 0-25 mM bei einer festen Menge LDH von einem Unit und zehn Units variiert. Aus den Ergebnissen dieser Messreihen wurde für zukünftige Messungen die optimale Menge an NADH-abhängiger Lactatdehydrogenase (LDH) auf ein Unit festgelegt. Mit dieser Menge an LDH ist eine schnelle nicht limitierende Reaktion im Detektionssystem unter ökonomischen Randbedingungen gesichert.

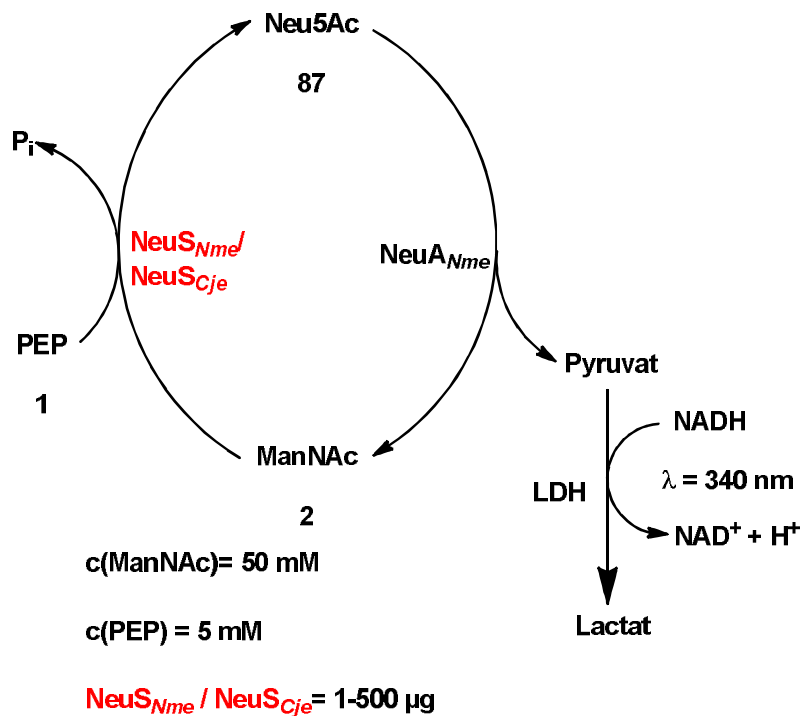
Im nächsten Schritt erfolgte die Optimierung der durch die Neuraminsäurealdolase aus *Neisseria meningitidis* ( $\text{NeuA}_{\text{Nme}}$ ) katalysierten Reaktion gekoppelt mit dem Detektionssystem (Schema 3.27).



**Schema 3.27:** Optimierung des gekoppelten Systems durch Variation der eingesetzten Menge an *N*-Acetylneuraminsäurealdolase  $\text{NeuA}_{Nme}$  bei unterschiedlichen Neu5Ac-Konzentrationen.

Bei einer festen Konzentration von 20 mM *N*-Acetylneuraminsäure **87** und ohne Zugabe von Pyruvat wurde die Aldolase mit 0,1-25 Units eingesetzt und vermessen, wiederum gegen eine Negativkontrolle. Aufgrund der natürlichen Hintergrundhydrolyse von Phosphoenolpyruvat **1** in wässrigen Lösungen zu Pyruvat wurde der Negativkontrolle noch 5 mM PEP zugesetzt. Die Auswertung der Messreihen zeigte, dass mit einer Menge von zehn Units  $\text{NeuA}_{Nme}$  das gekoppelte System ein sehr schnelle Reaktion zeigte.

Als nächstes war nun der Auftaktschritt des Recycling-Assays bezüglich der einzusetzenden Enzymmengen zu optimieren (Schema 3.28).



**Schema 3.28:** Optimierung des kompletten Recycling-Assays durch Variation der Menge an den *N*-Acetylneuraminsäuresynthasen NeuS<sub>Nme</sub>/NeuS<sub>Cje</sub> bei festen Konzentrationen der beiden natürlichen Substrate ManNAc **2** und PEP **1**.

Für diese Untersuchungen wurden zunächst die Konzentrationen an *N*-Acetylmannosamin **2** und Phosphoenolpyruvat **1** auf 50 mM ManNAc **2** und 5 mM PEP **1** festgesetzt und die Mengen der Enzyme variiert. Die Messreihen wurden separat für beide *N*-Acetylneuraminsäuresynthasen NeuS<sub>Nme</sub> und NeuS<sub>Cje</sub> durchgeführt. Da die spezifische Aktivität der Synthasen nicht bekannt war, wurden zwischen 1-500 µg lyophilisiertes Enzym eingesetzt. Die Negativkontrolle wurde ohne Zugabe von ManNAc **2** vermessen. Nach Auswertung der Messreihen wurden für die folgenden kinetischen Studien jeweils 50 µg NeuS<sub>Nme</sub> oder 200 µg NeuS<sub>Cje</sub> eingesetzt. In Tabelle 3.11 sind in die Ergebnisse der Optimierung noch einmal einer Übersicht zusammengefasst.



**Tabelle 3.11:** Überblick über die Ergebnisse aus der Optimierung des Recycling-Assays für beide *N*-Acetylneuraminsäuresynthasen NeuS<sub>Nme</sub> und NeuS<sub>Cje</sub>.

	NeuS <sub>Nme</sub>	NeuS <sub>Cje</sub>
Substrat [mM]	variabel	variabel
PEP [mM]	variabel	variabel
Enzymmenge [µg]	50	200
NeuA [U]	10	10
LDH [U]	1	1
NADH [mM]	0,25	0,25
DTT [mM]	1	1
Puffer	ad 200 µl (96-Lochplatte) ad 300 µl (Küvette)	ad 200 µl (96-Lochplatte) ad 300 µl (Küvette)

### 3.4.3 Bestimmung der kinetischen Konstanten für NeuS<sub>Nme</sub> und NeuS<sub>Cje</sub> für deren natürliche Substrate PEP und ManNAc

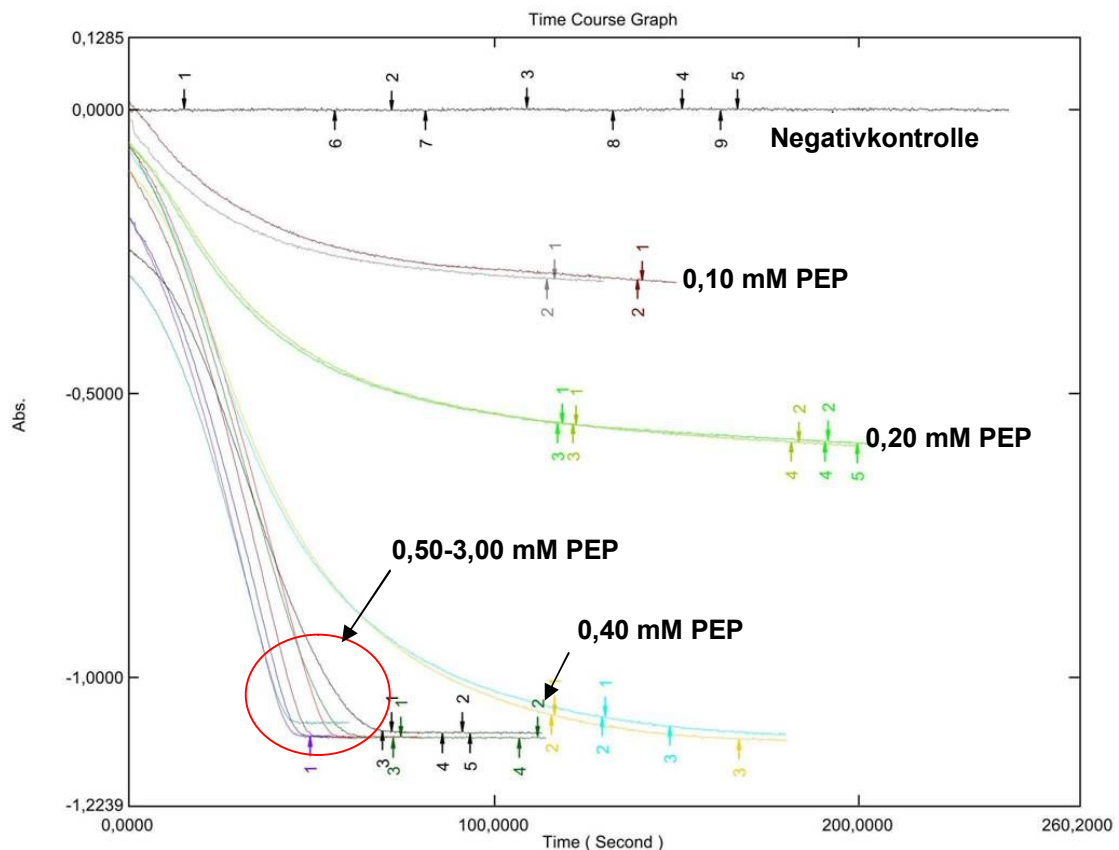
Zu Beginn der kinetischen Studien der beiden *N*-Acetylneuraminsäuresynthasen NeuS<sub>Nme</sub> und NeuS<sub>Cje</sub> wurden zunächst die kinetischen Daten für die beiden natürlichen Substrate *N*-Acetylmannosamin **2** und Phosphoenolpyruvat **1** bestimmt. Diese Messungen wurden zunächst in Küvetten am Photometer durchgeführt. Die jeweiligen Ansätze sind in Tabelle 3.12 gezeigt.

**Tabelle 3.12:** Kinetische Vermessung der natürlichen Substrate ManNAc **2** und PEP **1** in Küvetten mit Dreifachmessung pro Konzentration gegen eine Negativkontrolle.

	PEP [0-20 mM]	ManNAc [0-50 mM]	Negativ- kontrolle
ManNAc [1 M]	3 µl	0-15 µl	—
PEP [1 M]	0-6 µl	1,5 µl	1,5 µl
Synthase <sup>[a]</sup>	3 µl	3 µl	3 µl
LDH [1 U/µl]	1 µl	1 µl	1 µl
NeuA [1 U/µl]	10 µl	10 µl	10 µl
DTT [100 mM]	3 µl	3 µl	3 µl
NADH [10 mM]	7,5 µl	7,5 µl	7,5 µl
Bicin pH 8,0 <sup>[b]</sup>	Ad 300µl	Ad 300µl	Ad 300µl

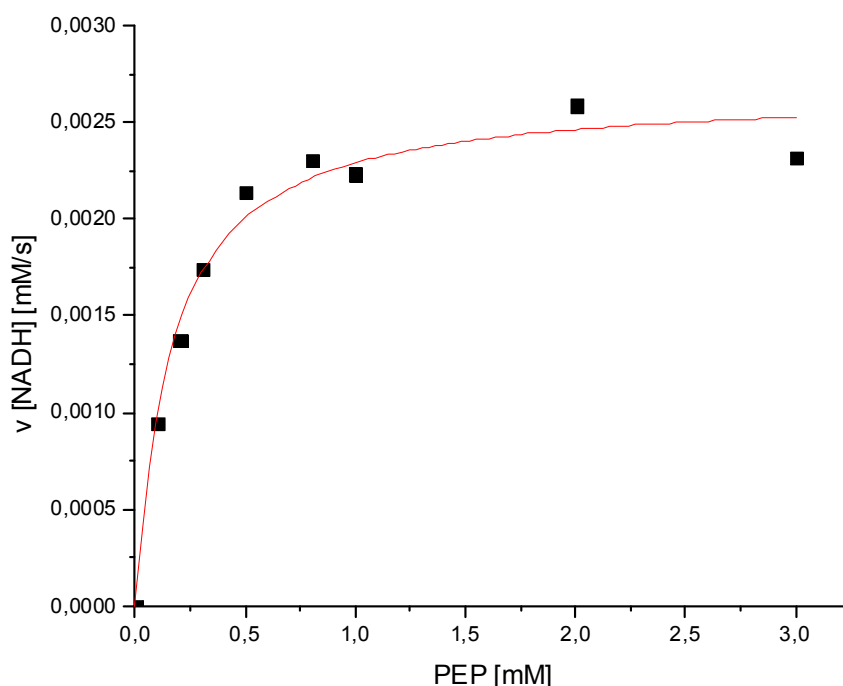
<sup>[a]</sup> c(NeuS<sub>Nme</sub>)= 5 mg/ml und c(NeuS<sub>Cje</sub>)= 20 mg/ml; <sup>[b]</sup> 50 mM Bicin pH 8,0 mit 10 mM MnCl<sub>2</sub>.

Zur Bestimmung des  $K_M$ -Wertes für Phosphoenolpyruvat **1** wurde die Konzentration von *N*-Acetylmannosamin **2** auf 10 mM festgesetzt und die Konzentration von Phosphoenolpyruvat **1** zwischen 0,0-10,0 mM variiert. Die Ansätze wurden zunächst soweit vorbereitet, dass alle Komponenten außer der jeweiligen Synthase in der Küvette für zwei Minuten bei 37°C im Photometer inkubiert wurden. Danach wurde die jeweilige Synthase als letzte Komponente zugegeben und die Messung gestartet.



**Abbildung 3.9:** Verlauf der Messkurven bei der photometrischen Verfolgung der Reaktion über die Absorptionsabnahme von NADH bei  $\lambda = 340 \text{ nm}$ .

Abbildung 3.9 zeigt die typischen Kurvenverläufe der Absorptionsabnahme bei einer Messreihe mit unterschiedlichen Konzentrationen, hier für PEP **1** im Konzentrationsbereich von 0,0-3,0 mM. Bei steigender Konzentration werden die Kurvenverläufe steiler. Die so erhaltenen Messdatenreihen werden mithilfe von OriginPro ausgewertet und über einen Fit an die Michaelis-Menten-Kinetik der  $K_M$ -Wert und  $v_{max}$  für PEP **1** (Abbildung 3.10) oder das jeweilige Substrat bestimmt.



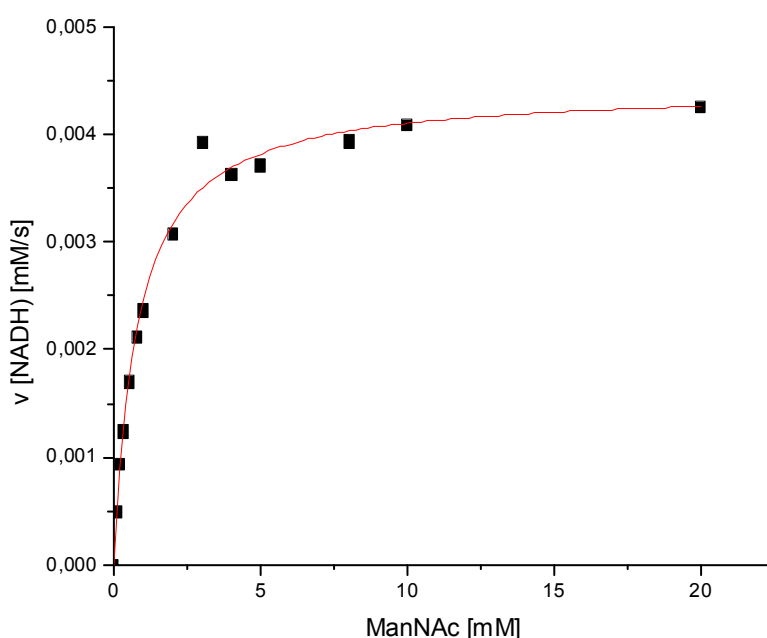
**Abbildung 3.10:** Beispiel für eine typische, aus den Rohdaten (Abb. 3.9) resultierende Sättigungskurve für PEP **1** vermessen mit der *N*-Acetylneuraminsäuresynthase NeuS<sub>Cje</sub>.

Aus diesen gemessenen Daten wurden noch weitere kinetische Daten, wie die Wechselzahl ( $k_{cat}$ ), die katalytische Effizienz ( $k_{cat}/K_M$ ) und die massenspezifische Aktivität (U/mg) der jeweiligen Synthase für die einzelnen Substrate berechnet. Um die Wechselzahl (turnover number) zu berechnen, musste zunächst die Enzymkonzentration im Lyophilisat mittels Bradford-Assay ermittelt werden.<sup>[133]</sup> Die Eichgerade für den Bradford-Assay wurde mit Rinderserumalbumin (BSA) aufgenommen und die Enzymkonzentration jeweils über eine Dreifachmessung bestimmt. In Tabelle 3.13 sind die Ergebnisse für Phosphoenolpyruvat **1** und die beiden *N*-Acetylneuraminsäuresynthasen NeuS<sub>Nme</sub> und NeuS<sub>Cje</sub> zusammengefasst.

**Tabelle 3.13:** Affinität, Aktivität, katalytische Effizienz und massenspezifische Aktivität der beiden *N*-Acetylneuraminsäuresynthasen NeuS<sub>Nme</sub> und NeuS<sub>Cje</sub> gegenüber dem natürlichen Substrat PEP **1**.

	$K_M$ [mM]	$k_{cat}$ [s <sup>-1</sup> ]	$k_{cat}/K_M$ [mM <sup>-1</sup> *s <sup>-1</sup> ]	U/mg
<b>NeuS<sub>Nme</sub></b>	0,23±0,05	6,0*10 <sup>-1</sup> ±0,004	2,59	3,12
<b>NeuS<sub>Cje</sub></b>	0,16±0,02	1,5*10 <sup>-1</sup> ±0,001	9,6*10 <sup>-1</sup>	3,12

Für die Vermessung von *N*-Acetylmannosamin **2** und aller weiteren Substrate wurde die Endkonzentration an Phosphoenolpyruvat **1** in den jeweiligen Messungen auf 5 mM ( $> 20 \times K_M$ ) festgelegt. Die Konzentration an *N*-Acetylmannosamin **2** wurde in einer ersten Messreihe zwischen 0,0-50,0 mM in Schritten von jeweils 5 mM vermessen. Die Auswertung der gemessenen Daten durch einen Fit an eine Michaelis-Menten-Kinetik mit Hilfe des Programmes OriginPro zeigte, dass dieser Konzentrationsbereich bereits zu hoch war, da schon ab einer Konzentration von 5-10 mM der Sättigungsbereich erreicht war. Daher wurde eine zweite Messreihe in einem Konzentrationsbereich von 0,0-20,0 mM durchgeführt, und die daraus ermittelte Kurve ist in Abbildung 3.11 gezeigt.



**Abbildung 3.11:** Aus den Rohdaten resultierende Sättigungskurve für das zweite natürliche Substrat ManNAc **2** vermessen mit der *N*-Acetylneuraminsäuresynthase NeuS<sub>Nme</sub>.

Die aus den Rohdaten und den Sättigungskurven resultierenden kinetischen Konstanten für das natürliche Substrat *N*-Acetylmannosamin **2** mit den jeweiligen *N*-Acetylneuraminsäuresynthasen NeuS<sub>Nme</sub> und NeuS<sub>Cje</sub> sind in Tabelle 3.14 zusammengefasst.

**Tabelle 3.14:** Affinität, Aktivität, katalytische Effizienz und massenspezifische Aktivität der beiden *N*-Acetylneuraminsäuresynthasen NeuS<sub>Nme</sub> und NeuS<sub>Cje</sub> gegenüber dem natürlichen Substrat ManNAc **2**.

	$K_M$ [mM]	$k_{cat}$ [s <sup>-1</sup> ]	$k_{cat}/K_M$ [mM <sup>-1</sup> *s <sup>-1</sup> ]	U/mg
<b>NeuS<sub>Nme</sub></b>	0,49±0,02	7,5*10 <sup>-1</sup> ±0,01	1,53	3,94
<b>NeuS<sub>Cje</sub></b>	0,69±0,03	1,6*10 <sup>-1</sup> ±0,02	2,3*10 <sup>-1</sup>	3,32

Aus den Daten erkennt man, dass beide Synthasen auch für *N*-Acetylmannosamin **2** eine vergleichbar hohe Affinität besitzen. Die Aktivität und katalytische Effizienz von NeuS<sub>Nme</sub> gegenüber *N*-Acetylmannosamin **2** ist um einen Faktor vier, beziehungsweise um eine Größenordnung besser als die der NeuS<sub>Cje</sub>. Vergleicht man die kinetischen Daten der beiden natürlichen Substrate Phosphoenolpyruvat **1** und *N*-Acetylmannosamin **2** aus dem kontinuierlichen Assay mit den Literaturwerten für NeuS<sub>Cje</sub> in der Literatur, so liegen die Daten des kontinuierlichen Assays um etwa ein bis zwei Größenordnungen besser als in der diskontinuierlichen Assaymethode (Tabelle 3.15).

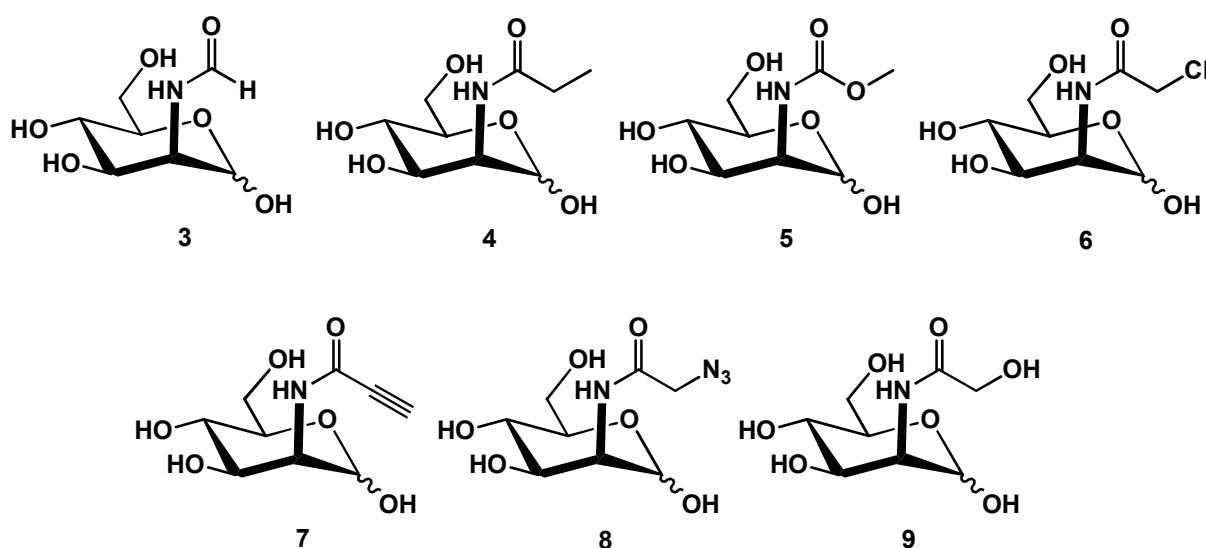
**Tabelle 3.15:** Vergleich der kinetischen Daten für die beiden natürlichen Substrate PEP **1** und ManNAc **2**.

	<b>NeuS<sub>Cje</sub></b>		
	$K_M$ [mM]	$k_{cat}$ [s <sup>-1</sup> ]	$k_{cat}/K_M$ [mM <sup>-1</sup> *s <sup>-1</sup> ]
<b>1</b>	7,3 <sup>[a]</sup>	3,2*10 <sup>-1</sup> <sup>[a]</sup>	4,3*10 <sup>-2</sup> <sup>[a]</sup>
	0,16 <sup>[b]</sup>	1,5*10 <sup>-1</sup> <sup>[b]</sup>	9,6*10 <sup>-1</sup> <sup>[b]</sup>
<b>2</b>	17,6 <sup>[a]</sup>	3,3*10 <sup>-1</sup> <sup>[a]</sup>	1,9*10 <sup>-2</sup> <sup>[a]</sup>
	0,69 <sup>[b]</sup>	1,6*10 <sup>-1</sup> <sup>[b]</sup>	2,3*10 <sup>-1</sup> <sup>[b]</sup>

<sup>[a]</sup> Daten aus dem diskontinuierlichen TBA-Assay. <sup>[58]</sup> <sup>[b]</sup> mit dem kontinuierlichen Assay ermittelt.

#### 3.4.4 Bestimmung der kinetischen Konstanten *N*-acetylierter Mannosaminderivate

Im Vergleich zu den kinetischen Konstanten der beiden natürlichen Substrate *N*-Acetylmannosamin **2** und Phosphoenolpyruvat **1** für die der *N*-Acetylneuraminsäuresynthasen NeuS<sub>Nme</sub> und NeuS<sub>Cje</sub> waren die synthetischen Mannosaminderivate von Interesse (Abbildung 3.12).



**Abbildung 3.12:** Für die kinetischen Untersuchungen als Substrate getesteten *N*-acylierten Mannosaminderivate **3-9**.

Aus der Literatur war bekannt, dass die *N*-Acetylneuraminsäuresynthasen NeuS<sub>Nme</sub> auch aliphatische Acylkettenverlängerungen bis hin zum *N*-Pentanoylmannosamin **91** toleriert.<sup>[58]</sup> Mit den im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten Mannosaminderivaten sollte die Flexibilität von NeuS<sub>Nme</sub> und NeuS<sub>Cje</sub> nicht nur für Kettenverlängerungen, sondern auch für Änderungen in der elektronischen Struktur der Seitenkette untersucht werden. Die Basis für die Auswahl an getesteten Mannosaminderivaten waren positive Ergebnisse aus früheren Arbeiten in unserer Arbeitsgruppe mit der *N*-Acetylneuraminsäurealdolase NeuA<sub>Nme</sub><sup>[69]</sup>, die sicherstellen, dass die Spaltung der entstehenden Neuraminsäurederivate durch die Aldolase nicht zum limitierenden Schritt wird. Die Messungen erfolgten zunächst wiederum in Küvetten am Photometer. In Tabelle 3.16 sind die Ansätze der Messproben aufgelistet.

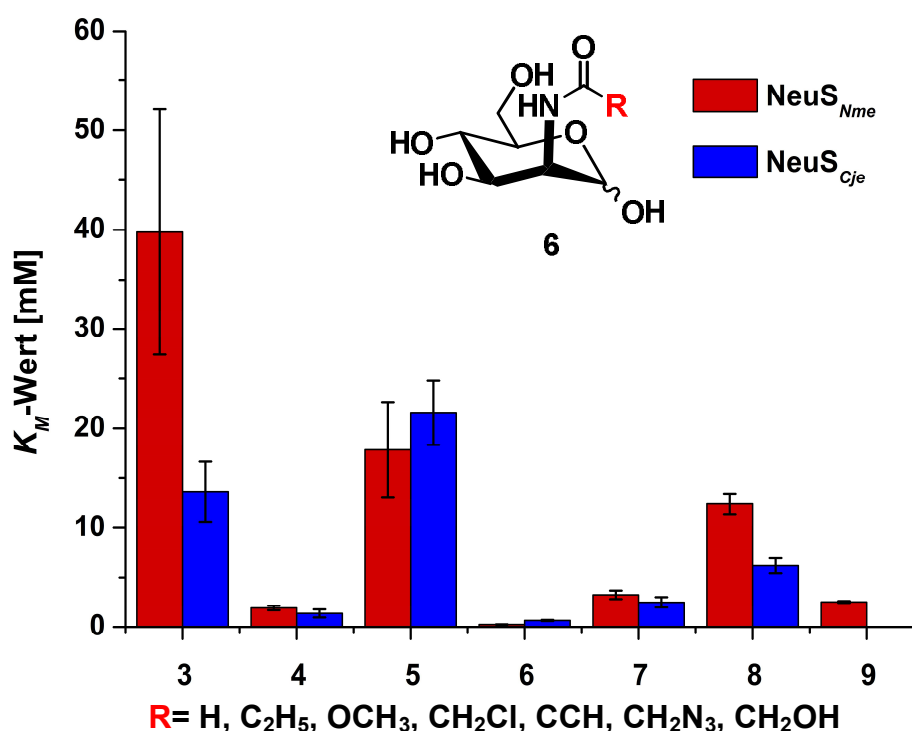
**Tabelle 3.16:** Ansätze für die Vermessung der *N*-acylierten Mannosaminderivate mit den beiden *N*-Acetylneuramisäuresynthasen NeuS<sub>Nme</sub> und NeuS<sub>Cje</sub>.

	<b>Substrat [0-250 mM]</b>	<b>Positiv- kontrolle</b>	<b>Negativ- kontrolle</b>
Substrat [1 M]	<b>0-75 µl</b>	—	—
ManNAc [1 M]	—	1,5 µl	—
PEP [1 M]	1,5 µl	1,5 µl	1,5 µl
Synthase <sup>[a]</sup>	3 µl	3 µl	3 µl
LDH [1 U/µl]	1 µl	1 µl	1 µl
NeuA [1 U/µl]	10 µl	10 µl	10 µl
DTT [100 mM]	3 µl	3 µl	3 µl
NADH [10 mM]	7,5 µl	7,5 µl	7,5 µl
Bicin pH 8,0 <sup>[b]</sup>	Ad 300µl	Ad 300µl	Ad 300µl

<sup>[a]</sup> c(NeuS<sub>Nme</sub>)= 5 mg/ml und c(NeuS<sub>Cje</sub>)= 20 mg/ml; <sup>[b]</sup> 50 mM Bicin pH 8,0 mit 10 mM MnCl<sub>2</sub>, bei Messungen in 96-Lochplatten verringert sich das Volumen auf 200 µl

Die Konzentration an den jeweiligen Substraten wurde zwischen 0-250 mM variiert. Zur Orientierung wurde jeweils eine Messung mit einer festen Konzentration von 10 mM Substrat durchgeführt. Je nach Verlauf der Messkurve wurde der Konzentrationsbereich entsprechend erweitert. Für die zu vermessenden Substrate wurden die verschiedenen Messpunkte im Konzentrationsbereich bis 50 mM Substrat in einem Intervall von fünf bis zehn mM-Schritten gewählt, Konzentrationen über 50 mM bis 250 mM in einem Intervall von 20-50 mM-Schritten vermessen. Die  $K_M$ -Werte der beiden Synthasen für die Mannosaminderivate **3-9** sind in Abbildung 3.13 als Balkendiagramme dargestellt.

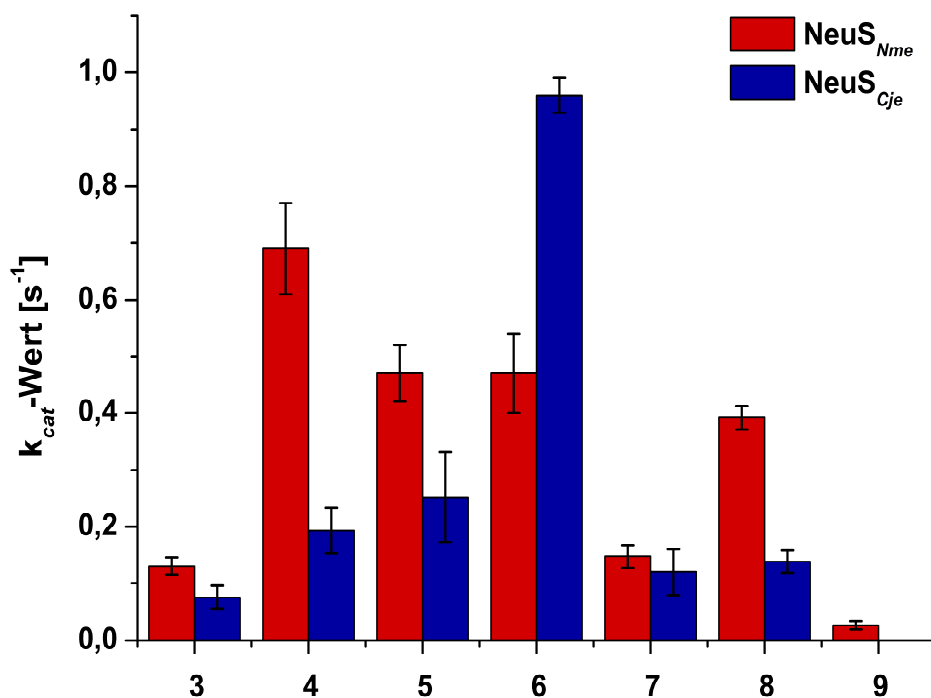




**Abbildung 3.13:**  $K_M$ -Werte der beiden Synthasen NeuS<sub>Nme</sub> und NeuS<sub>Cje</sub> gegenüber den *N*-modifizierten Mannosaminderivaten 3 bis 9. Substrat 9 wurde nur mit NeuS<sub>Nme</sub> vermessen.

Der Vergleich zwischen den ermittelten  $K_M$ -Werten der einzelnen Mannosaminderivate 3-9 für NeuS<sub>Nme</sub> und dem  $K_M$ -Wert des natürlichen Substrates *N*-Acetylmannosamin 2 zeigt, dass die Synthase für alle Mannosaminderivate eine relativ gute Affinität besitzt. Neben *N*-Acetylmannosamin 2 mit 0,49 mM besitzt die Synthase zu *N*-Chloracetylmannosamin 6 die beste Affinität mit einem  $K_M$ -Wert von 0,25 mM. Eine Änderung in der Seitenkette des natürlichen Substrates durch Substitution der terminalen Methylgruppe durch ein sterisch anspruchsvolleres stark elektronegatives Chloratom wirkt sich nicht negativ auf die Affinität der NeuS<sub>Nme</sub> aus. Die anderen Mannosaminderivate weisen einen um ein bis zwei Größenordnungen schlechteren  $K_M$ -Wert auf. Gute Affinitäten erreichen noch die Derivate mit einer Verlängerung der Seitenkette um ein Kohlenstoffatom, sowohl das gesättigte 4 mit einem  $K_M$ -Wert von 1,9 mM als auch das entsprechende ungesättigte Alkin 7 mit einem  $K_M$ -Wert von 3,2 mM. Auch eine terminale Azidsubstitution der Seitenkette in 8 kann die NeuS<sub>Nme</sub> tolerieren. Eine Verkürzung der Seitenkette hingegen lässt die Affinität signifikant sinken, was ein  $K_M$ -Wert von 39,8 mM für das *N*-Formylmannosamin 3 deutlich macht.

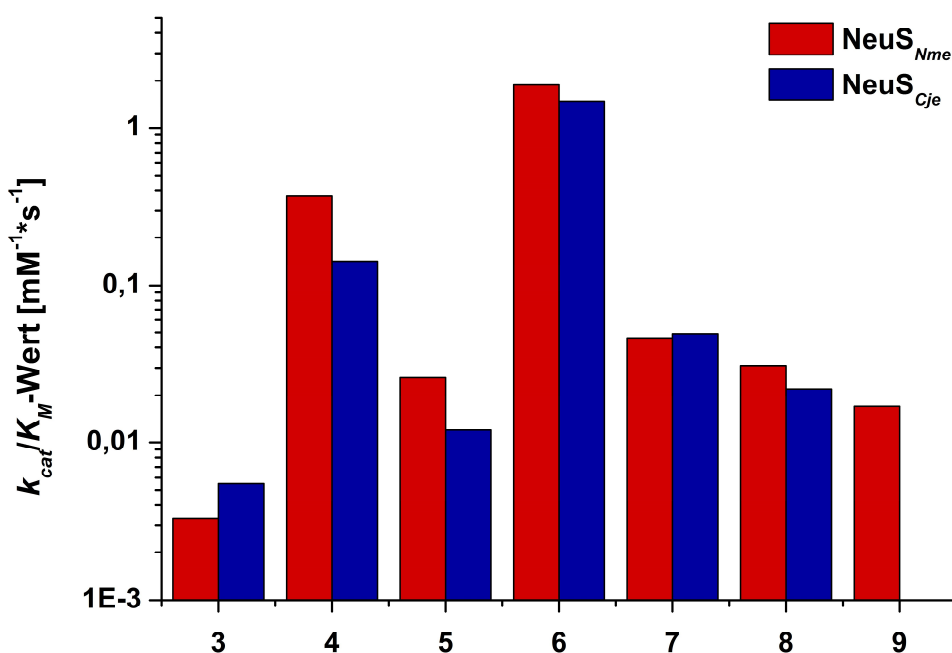
Dieser Trend in der Affinität der NeuS<sub>Nme</sub> zu den Substraten findet sich auch bei der NeuS<sub>Cje</sub> wieder. Deren  $K_M$ -Werte für einzelnen Mannosaminderivate **3-9** liegen in der gleichen Größenordnung wie bei der NeuS<sub>Nme</sub>. Einen großen Unterschied zeigt jedoch die NeuS<sub>Cje</sub> gegenüber *N*-Formylmannosamin **3** mit einer um den Faktor drei besser Affinität als die NeuS<sub>Nme</sub>. Abbildung 3.14 zeigt graphisch die relative Aktivität der beiden Synthesen gegenüber den Mannosaminderivaten **3-9**.



**Abbildung 3.14:** Vergleich der molekularen Aktivität ( $k_{cat}$ -Wert) der beiden *N*-Acetylneuraminsäuresynthasen NeuS<sub>Nme</sub> und NeuS<sub>Cje</sub> mit den jeweiligen *N*-acylierten Mannosaminderivaten **3-9**. Substrat **9** wurde nur mit NeuS<sub>Nme</sub> vermessen.

Die katalytische Leistungsfähigkeit der beiden Synthesen gegenüber den verschiedenen Mannosaminderivaten **3-9** wird über  $k_{cat}$ -Werte beschrieben. Diese liegen für beide Synthesen in der gleichen Größenordnung, jedoch sind die molekularen Aktivitäten für NeuS<sub>Nme</sub> um einen Faktor zwei bis vier besser im Vergleich zu denen der NeuS<sub>Cje</sub>. Eine Ausnahme stellt hier das *N*-Chloracetylmannosamin **6** dar, wofür die NeuS<sub>Cje</sub> mit 0,96/s eine doppelt so gute molekulare Aktivität dem Substrat gegenüber besitzt, wie die NeuS<sub>Nme</sub> mit 0,47/s. Die schlechteste katalytische Leistungsfähigkeit besitzen beide Enzyme gegenüber dem *N*-Formylmannosamin **3** mit 0,13/s bei NeuS<sub>Nme</sub> und 7,2·10<sup>-2</sup>/s bei NeuS<sub>Cje</sub> und dem *N*-Propinoylmannosamin **4** mit 0,15/s bei NeuS<sub>Nme</sub> und 0,12/s bei NeuS<sub>Cje</sub>.

Im Vergleich der molekularen Aktivitäten der natürlichen Substrate mit den Mannosaminderivaten, zeigt die NeuS<sub>Nme</sub> durchweg schlechtere Effizienzen für die Derivate als für die natürlichen Substrate. Bei NeuS<sub>Cje</sub> sieht das Bild etwas anders aus, da die NeuS<sub>Cje</sub> neben dem schon erwähnten *N*-Chloracetylmannosamin **6** auch gegenüber *N*-Methoxycarbonylmannosamin **5** mit 2,52/s und *N*-Propanoylmannosamin **4** mit 1,53/s, eine erhöhte katalytische Leistungsfähigkeit zeigt.



**Abbildung 3.15:** Vergleich der katalytischen Effizienz ( $k_{cat}/K_M$ ) der beiden *N*-Acetylneuraminsäuresynthasen NeuS<sub>Nme</sub> und NeuS<sub>Cje</sub> gegenüber den jeweiligen *N*-modifizierten Mannosaminderivaten **3-9**. Für den besseren Vergleich ist die Darstellung hier logarithmisch gewählt. Substrat **9** wurde nur mit der NeuS<sub>Nme</sub> vermessen.

Als ein Maß für die Substratspezifität dient die katalytische Effizienz ( $k_{cat}/K_M$ ), die für die beiden Synthasen NeuS<sub>Nme</sub> und NeuS<sub>Cje</sub> in Abbildung 3.15 als Balkendiagramm dargestellt ist. Beide Synthasen zeigen annähernd gleiche katalytische Effizienzen zu den einzelnen Derivaten. Die beste Substratspezifität besitzen sie gegenüber dem *N*-Chloracetylmannosamin **6** mit 1,9 mM<sup>-1</sup>\*s<sup>-1</sup> für die NeuS<sub>Nme</sub> und 1,5 mM<sup>-1</sup>\*s<sup>-1</sup> für die NeuS<sub>Cje</sub>. Der Wert für NeuS<sub>Nme</sub> liegt im gleichen Bereich wie die katalytische Effizienz für das natürliche Substrat *N*-Acetylmannosamin **2**. Bei der NeuS<sub>Cje</sub> ist die Substratspezifität gegenüber *N*-Chloracetylmannosamin **6** sogar eine Größenordnung besser als mit dem natürlichen Substrat *N*-Acetylmannosamin **2**. Die katalytische Effizienz mit den Substraten

*N*-Propanoylmannosamin **4**, *N*-Propinoylmannosamin **7** und *N*-Azidoacetylmannosamin **8** sind um eine Größenordnung niedriger als mit dem *N*-Chloracetylmannosamin **6**. Die schlechteste Substratspezifität zeigen beide Synthasen gegenüber dem *N*-Formylmannosamin **3** mit  $3,3 \cdot 10^{-3} \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  für die NeuS<sub>Nme</sub> und  $5,5 \cdot 10^{-3} \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  für die NeuS<sub>Cje</sub>. Diese Messungen wurden für einen Teil der Substrate nochmals in 96-Lochplatten im Plattenphotometer durchgeführt, mit geringeren Volumina und geringerem Verbrauch an Substraten und Enzymem. Die Ergebnisse dieser Messungen waren identisch mit den in Tabelle 3.17 gelisteten.

**Tabelle 3.17:** Affinität, Aktivität, katalytische Effizienz und massenspezifische Aktivität der beiden *N*-Acetylneuraminsäuresynthasen NeuS<sub>Nme</sub> und NeuS<sub>Cje</sub> gegenüber den Substraten **3-9** sowie dem natürlichen Substrat *N*-Acetylmannosamin **2** im Überblick.

NeuS <sub>Nme</sub>				
	$K_M [\text{mM}]$	$k_{cat} [\text{s}^{-1}]$	$k_{cat}/K_M [\text{mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}]$	U/mg
<b>2</b>	0,5±0,02	$7,5 \cdot 10^{-1} \pm 0,01$	1,53	3,94
<b>3</b>	40,0±12,34	$1,3 \cdot 10^{-1} \pm 0,02$	$3,3 \cdot 10^{-3}$	$6,9 \cdot 10^{-1}$
<b>4</b>	1,9±0,23	$6,9 \cdot 10^{-1} \pm 0,08$	$3,7 \cdot 10^{-1}$	3,65
<b>5</b>	17,9±4,74	$4,7 \cdot 10^{-1} \pm 0,05$	$2,6 \cdot 10^{-2}$	2,46
<b>6</b>	0,25±0,021	$4,7 \cdot 10^{-1} \pm 0,07$	1,88	2,43
<b>7</b>	3,2±0,43	$1,5 \cdot 10^{-1} \pm 0,02$	$4,6 \cdot 10^{-2}$	$7,7 \cdot 10^{-1}$
<b>8</b>	12,4±1,04	$3,9 \cdot 10^{-1} \pm 0,02$	$3,1 \cdot 10^{-2}$	2,06
<b>9</b>	2,5±0,09	$2,7 \cdot 10^{-2} \pm 0,01$	$1,1 \cdot 10^{-2}$	$8,2 \cdot 10^{-1}$

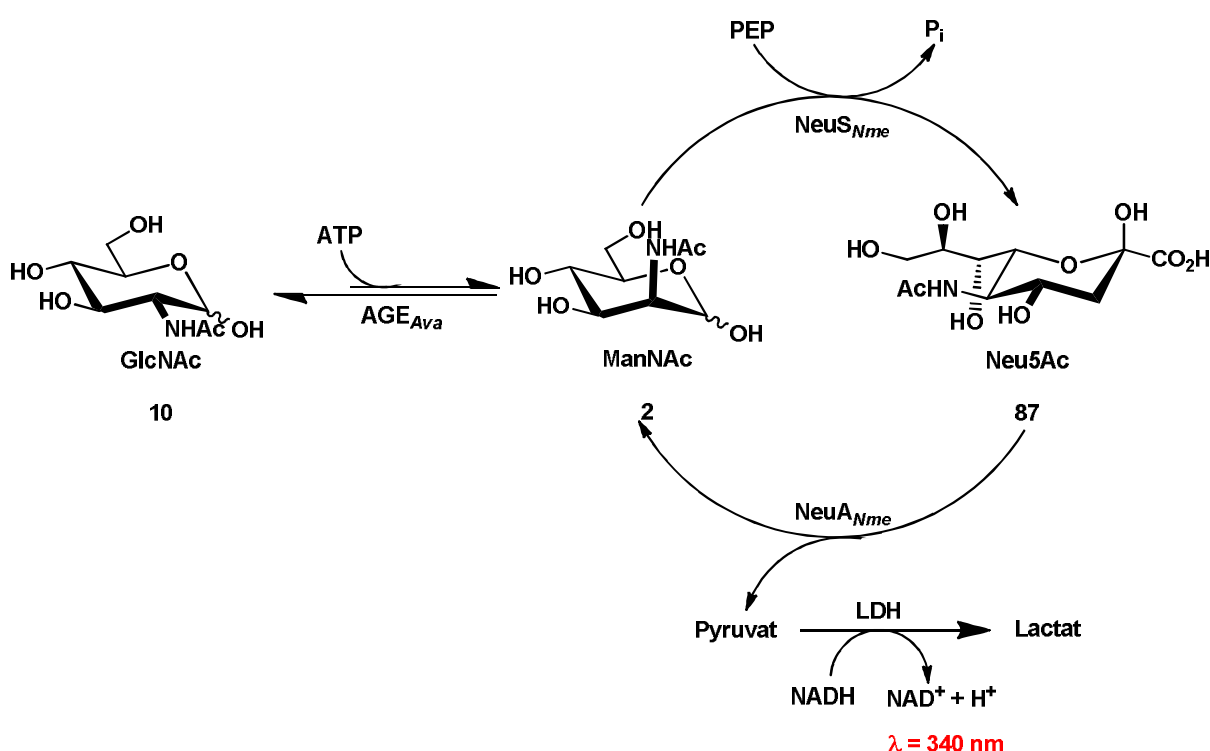
NeuS <sub>Cje</sub>				
	$K_M [\text{mM}]$	$k_{cat} [\text{s}^{-1}]$	$k_{cat}/K_M [\text{mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}]$	U/mg
<b>2</b>	0,7±0,03	$1,6 \cdot 10^{-1} \pm 0,02$	$2,3 \cdot 10^{-1}$	3,32
<b>3</b>	13,7±3,02	$7,6 \cdot 10^{-2} \pm 0,02$	$5,5 \cdot 10^{-3}$	$3,9 \cdot 10^{-1}$
<b>4</b>	1,4±0,4	$1,9 \cdot 10^{-1} \pm 0,04$	$1,4 \cdot 10^{-1}$	1,01
<b>5</b>	21,6±3,23	$2,5 \cdot 10^{-1} \pm 0,08$	$1,2 \cdot 10^{-2}$	1,31
<b>6</b>	0,7±0,05	$9,6 \cdot 10^{-1} \pm 0,03$	1,48	1,25
<b>7</b>	2,5±0,51	$1,2 \cdot 10^{-1} \pm 0,04$	$4,9 \cdot 10^{-2}$	$6,2 \cdot 10^{-1}$
<b>8</b>	6,2±0,76	$1,4 \cdot 10^{-1} \pm 0,02$	$2,2 \cdot 10^{-2}$	$7,2 \cdot 10^{-1}$

---

Zusammenfassend haben die beiden aus unterschiedlichen Mikroorganismen stammenden *N*-Acetylneuraminsäuresynthasen gegenüber einer Seitenkettenmodifikation in der Acetamidogruppe an der C2-Position im Mannosamin die gleiche Toleranz. Einen positiven Ausreißer in dieser Gruppe stellt das *N*-Chloracetylmannosamin **6** dar, dessen kinetische Daten in der Größenordnung des natürlichen Substrates *N*-Acetylmannosamin **2** liegen. Ein Grund hierfür könnte in der Hydrolyseempfindlichkeit des Substrates liegen. Durch die Hydrolyse von **2** entsteht das ebenfalls von beiden *N*-Acetylneuraminsäuresynthasen relativ gut akzeptierte Substrat *N*-Glykolylmannosamin **9**. In diesem Falle entsteht das Problem einer Konkurrenzsituation zwischen den beiden Substraten und dem jeweiligen Enzym, was eine mögliche Erklärung für die guten kinetischen Daten von **2** darstellt.

### 3.4.5 Kontinuierlicher gekoppelter Enzym-Assay mit AGE<sub>Ava</sub> und den *N*-Acetylneuraminsäuresynthasen NeuS<sub>Nme</sub> und NeuS<sub>Cje</sub>

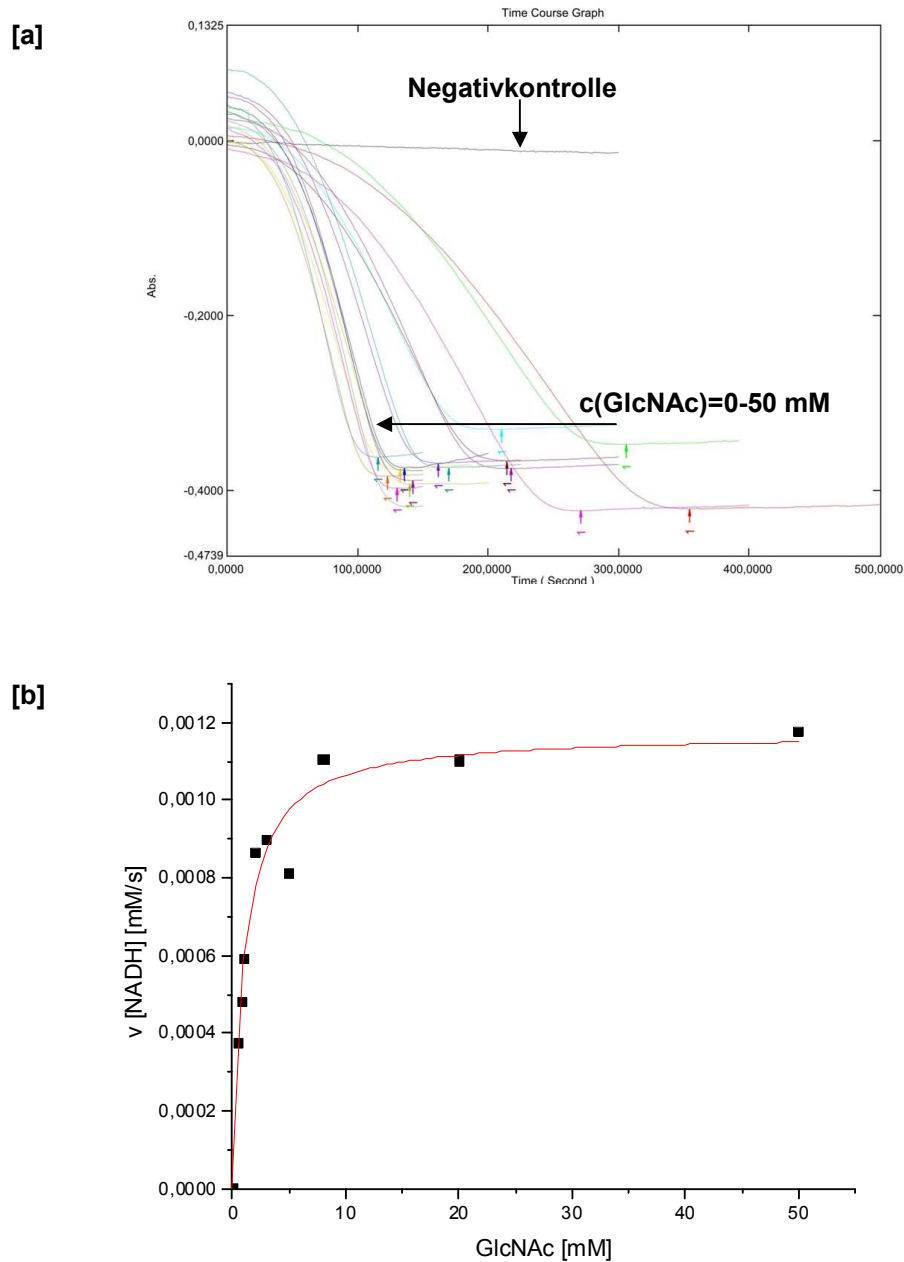
Nachdem alle Mannosaminderivate mit den Synthasen vermessen waren, war der letzte Schritt zur Optimierung des gekoppelten Systems die durch die *N*-Acetylglucosamin-2-epimerase (AGE<sub>Ava</sub>, EC 5.1.3.8)<sup>[113]</sup> katalysierte Gleichgewichtsreaktion dem etablierten kontinuierlichen System vorzuschalten (Schema 3.29).



**Schema 3.29:** Gekoppelter, kontinuierlicher Enzym-Assay bestehend aus dem Recycling-Assay mit vorgeschalteter Epimerisierungsreaktion, katalysiert durch die *N*-Acetylglucosamin-2-epimerase AGE<sub>Ava</sub> (EC 5.1.3.8).

Diese ATP-abhängige Epimerase wurde von der Arbeitsgruppe von Castiglione<sup>[113]</sup> zur Verfügung gestellt. Als erstes wurde das natürliche Substrat *N*-Acetylglucosamin **10** mit der Epimerase vermessen. Die Endkonzentration an ATP in den Proben lag bei 1 mM, die Konzentration an *N*-Acetylglucosamin **10** wurde zwischen 0-50 mM variiert. Die Endkonzentrationen an PEP **1** und NADH, sowie die Enzymmengen der am Recycling-Assay beteiligten Enzyme wurden nicht verändert. Als Synthase wurde für die Messungen die NeuS<sub>Nme</sub> verwendet. Da die Aktivität der Epimerase unbekannt war, wurden zunächst

verschiedene orientierende Messungen mit unterschiedlichen Volumina an Epimeraselösung durchgeführt.



**Abbildung 3.16:** **[a]** Verlauf der Messkurven bei steigender *N*-Acetylglucosaminkonzentration. Die Absorption nimmt entsprechend schneller ab. **[b]** Aus den Rohdaten von **[a]** mittels eines Fites an eine Michaelis-Menten-Kinetik ermittelte Sättigungskurve zur Bestimmung des  $K_M$ -Wertes von *N*-Acetylglucosamin **10**.

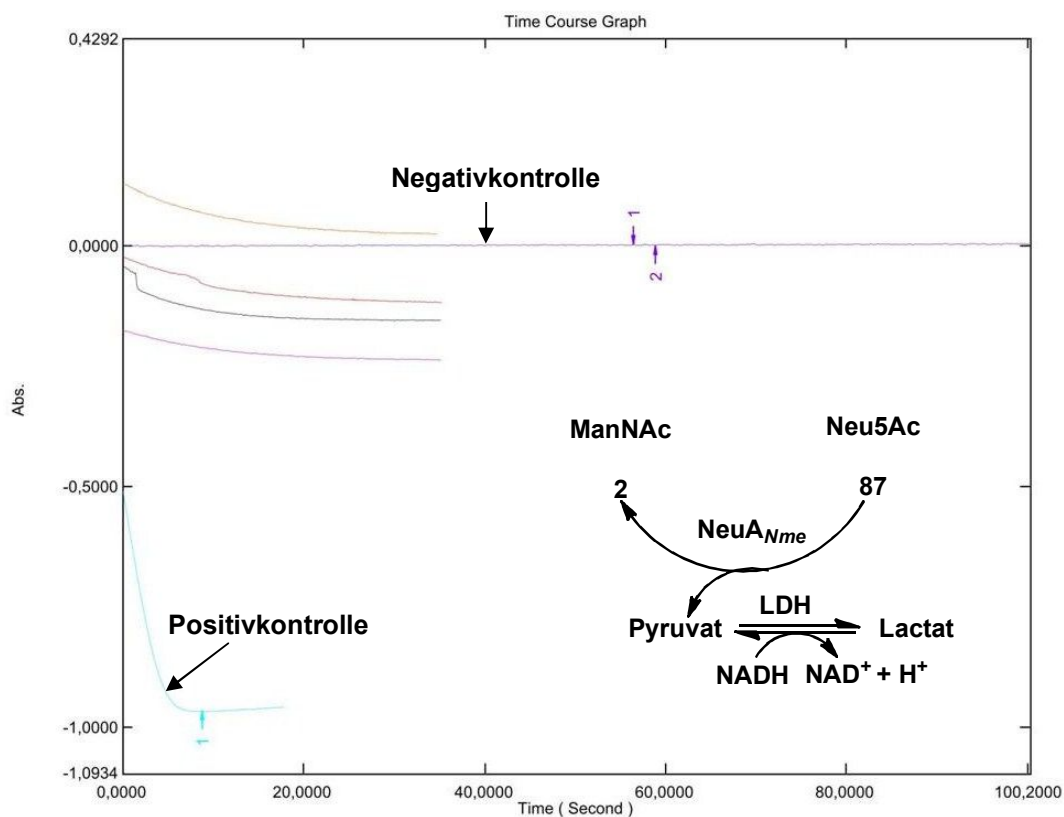
---

Die aus den ausgewerteten Rohdaten resultierende Sättigungskurve liefert einen  $K_M$ -Wert für *N*-Acetylglucosamin **10** von 1.02 mM, was einer sehr guten Affinität des Enzyms zu seinem natürlichen Substrat entspricht. Bevor nun dieses System von der Küvette auf 96-Lochplatte übertragen wurde, um es effizienter und schneller zu machen, wurden zunächst mit den zu vermessenden Glucosaminderivaten **10-15** einige orientierende Testmessungen in Küvetten durchgeführt, um den Rahmen des Konzentrationsbereiches für die Messungen abzustecken. Diese Messungen wurden wie alle früheren Messungen durchgeführt, wobei die bis auf das entscheidende Enzym vollständigen Proben 2 Minuten bei 37°C Grad inkubiert wurden und dann die Reaktion durch Zugabe des Enzymes gestartet. In allen Messungen zuvor blieb während der Vorinkubation der Wert der Absorption stabil und nahm erst nach Zugabe des zu bewertenden Enzyms im Verlauf der Reaktion ab. Bei den Testmessungen der Glucosaminderivate wurde jedoch überraschend festgestellt, dass die Absorption und somit die NADH-Konzentration schon in der Präinkubationszeit, d.h. in Abwesenheit der *N*-Acetylglucosamin-2-epimerase ( $AGE_{Ava}$ ) je nach verwendetem Derivat unterschiedlich schnell abnahm.

Um den Grund für diese unerwartete und teilweise rasante Absorptionsabnahme schon vor der eigentlichen Reaktion zu identifizieren, wurde das komplette System nochmals detailliert untersucht. Die Vorgehensweise entsprach der bei der Optimierung des Assays verwendeten. Um sicher zu stellen, dass das Edukt *N*-Acetylglucosamin **10** nicht durch Spuren von *N*-Acetylmannosamin verunreinigt ist, wurde dieses 2D-NMR-spektroskopisch analysiert. Die Auswertung des Spektrensatzes zeigte keinerlei Verunreinigungen im Edukt.

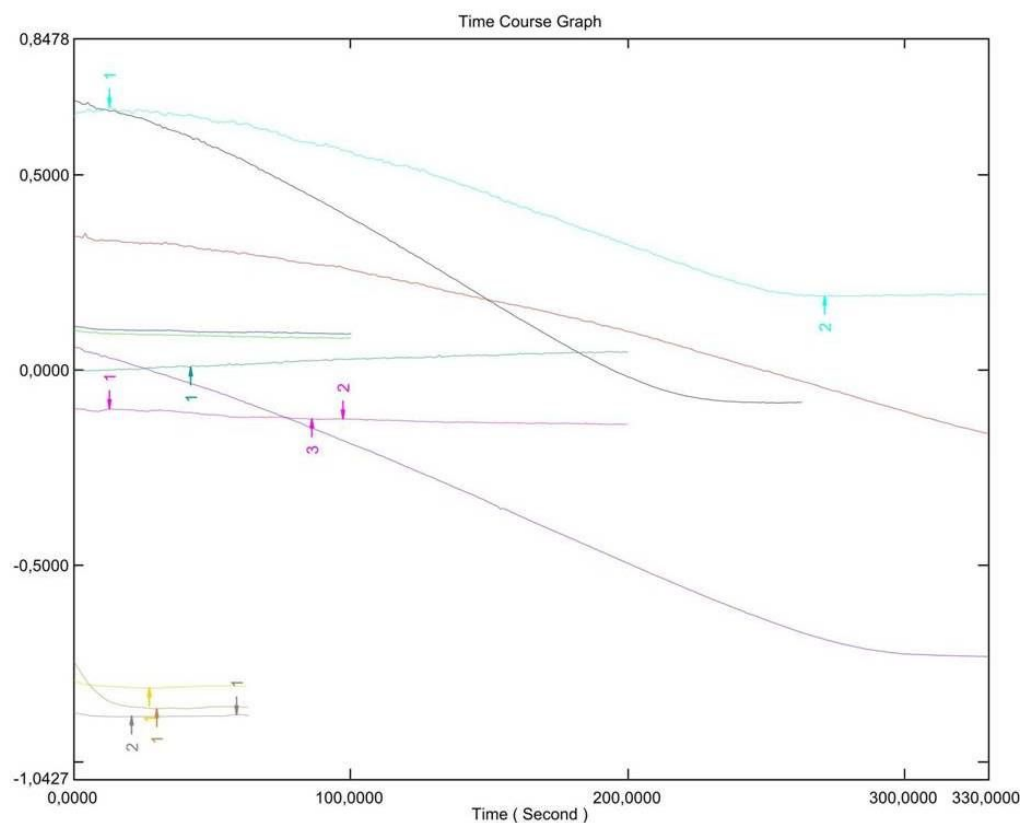
Ausgehend vom Detektionssystem wurde jede Stufe photometrisch daraufhin verfolgt, wie sie sich in Gegenwart von Glucosaminderivaten **10-15** verhielt. Das von der Lactatdehydrogenase katalysierte Detektionssystem zeigte in Anwesenheit der Glucosaminderivate keine Absorptionsabnahme. Dasselbe Resultat lieferte auch die Untersuchung des Systems gekoppelt mit dem vorgeschalteten Schritt katalysiert durch die Neuraminsäurealdolase NeuA<sub>Nme</sub>. Auch in Abwesenheit von Pyruvat und durch Ersetzen der *N*-Acetylneuraminsäure **87** gegen verschiedene Glucosaminderivate **10-15** konnte keine Absorptionsabnahme detektiert werden (Abbildung 3.17).





**Abbildung 3.17:** Untersuchung des Assays zur Lokalisierung der Ursache für die unerwartete NADH-Abnahme in Abwesenheit der *N*-Acetylglucosamin-2-Epimerase AGE<sub>Ava</sub>. Anstelle von Neu5Ac **87** und in Abwesenheit von Pyruvat wurden hier die Glucosaminderivate **10-15** für die Messungen eingesetzt. Als Positivkontrolle für die Messungen diente *N*-Acetylneuraminsäure **87**.

Damit blieb der Auftaktschritt des Recycling-Assays, der durch die Synthasen katalysiert wird, die letzte Möglichkeit für die unerwartete Absorptionsabnahme. Um dies zu überprüfen, wurde das *N*-Acetylmannosamin **2** in den kinetischen Messungen zuerst gegen *N*-Acetylglucosamin **10** ausgetauscht. Um einen negativen Einfluss von Phosphoenolpyruvat **1** auf die Glucosaminderivate zu untersuchen, wurden zwei Messreihen durchgeführt: Eine Messreihe in Anwesenheit und die zweite in Abwesenheit von Phosphoenolpyruvat **1**. In Abwesenheit von Phosphoenolpyruvat **1** wurde keine Absorptionsabnahme detektiert. In Anwesenheit von *N*-Acetylglucosamin **10** und Phosphoenolpyruvat **1** nahm die Absorption langsam und stetig ab. (Abbildung 3.18).

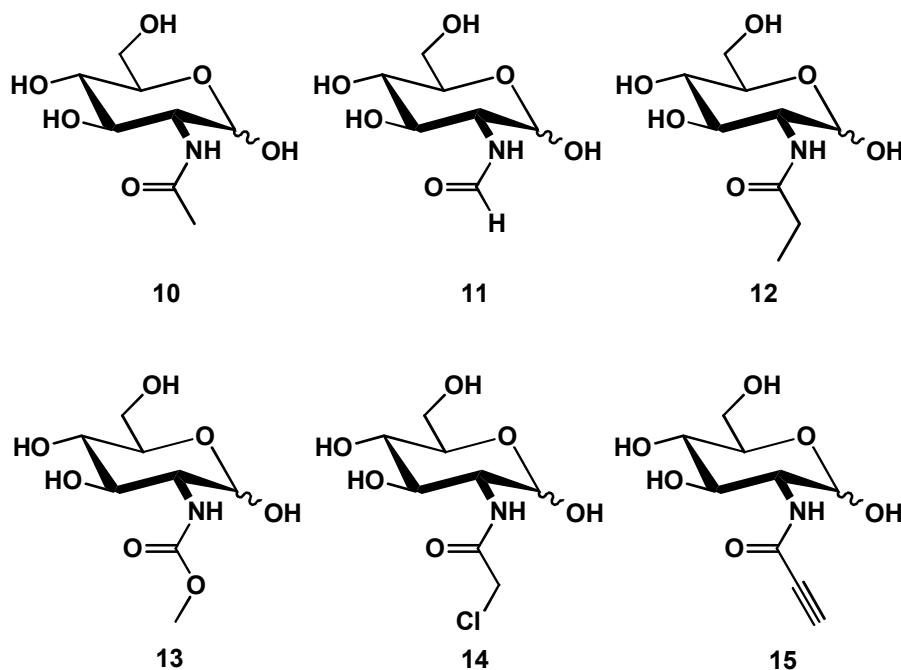


**Abbildung 3.18:** Untersuchung des kompletten Recycling-Assays. Es wurden zwei unterschiedliche Messreihen durchgeführt, eine in Anwesenheit von Phosphoenolpyruvat **1** und den jeweiligen Glucosaminderivaten bei 20 mM und die andere in Abwesenheit von Phosphoenolpyruvat **1**. Die Positivkontrolle wurde mit *N*-Acetylmannosamin **2** als Substrat gemessen.

Durch einen Austausch von *N*-Acetylglucosamin **10** als Substrat durch die entsprechenden Glucosaminderivate **10-15** erhielt man interessante Messreihen. Vor allem die Messung mit *N*-Chloracetylglucosamin **15** zeigte eine rasante Abnahme der Absorption. Die Endkonzentration der Glucosaminderivate in den Proben war 20 mM, die an *N*-Acetylmannosamin **2** in der Positivkontrolle war 5 mM. Die Reaktion mit *N*-Chloracetylglucosamin **15** war halb so langsam wie die der Positivkontrolle. Aus diesen Ergebnissen geht hervor, dass die beiden *N*-Acetylneuraminsäuresynthasen NeuS<sub>Nme</sub> und NeuS<sub>Cje</sub> eine noch breitere Substrattoleranz besitzen als vermutet und anscheinend nicht konfiguratativ fixiert sind. Um diese Vermutung zu bestätigen, wurden die kinetischen Studien auf die Derivate von Glucosamin ausgeweitet.

### 3.4.6 Bestimmung der kinetischen Konstanten *N*-acylierter Glucosaminderivate mit den beiden Synthasen NeuS<sub>Nme</sub> und NeuS<sub>Cje</sub>

Die als Substrate für die *N*-Acetylglucosamin-2-epimerase (AGE<sub>Ava</sub>) synthetisierten Glucosaminderivate **10-15** (Abbildung 3.19) wurden nun direkt als Substrate für die beiden *N*-Acetylneuraminsäuresynthasen NeuS<sub>Nme</sub> und NeuS<sub>Cje</sub> im Assay eingesetzt und vermessen.



**Abbildung 3.19:** Für die kinetischen Untersuchungen von NeuS<sub>Nme</sub> und NeuS<sub>Cje</sub> als Substrate getesteten *N*-acylierten Glucosaminderivate **10-15**.

Die Substitutionen in der Seitenkette des Glucosamins waren in struktureller und elektronischer Variation den Mannosaminderivaten **3-9** identisch. Die kinetischen Messungen wurden zum Einen wieder in Küvetten am Photometer durchgeführt und zum anderen zur Miniaturisierung und schnelleren, reproduzierbaren Datenakquisition auf 96-Wellplatten im Plattenphotometer bei 37°C und  $\lambda = 340$  nm durchgeführt (Schema 3.18).

**Tabelle 3.18:** Ansatzgrößen zur Bestimmung der kinetischen Daten der Glucosaminderivate in der Küvette und der 96-Lochplatte. Wichtigste Änderungen gegenüber den Mannosaminderivaten waren höhere Konzentrationen der Substrate und größere Enzymmengen.

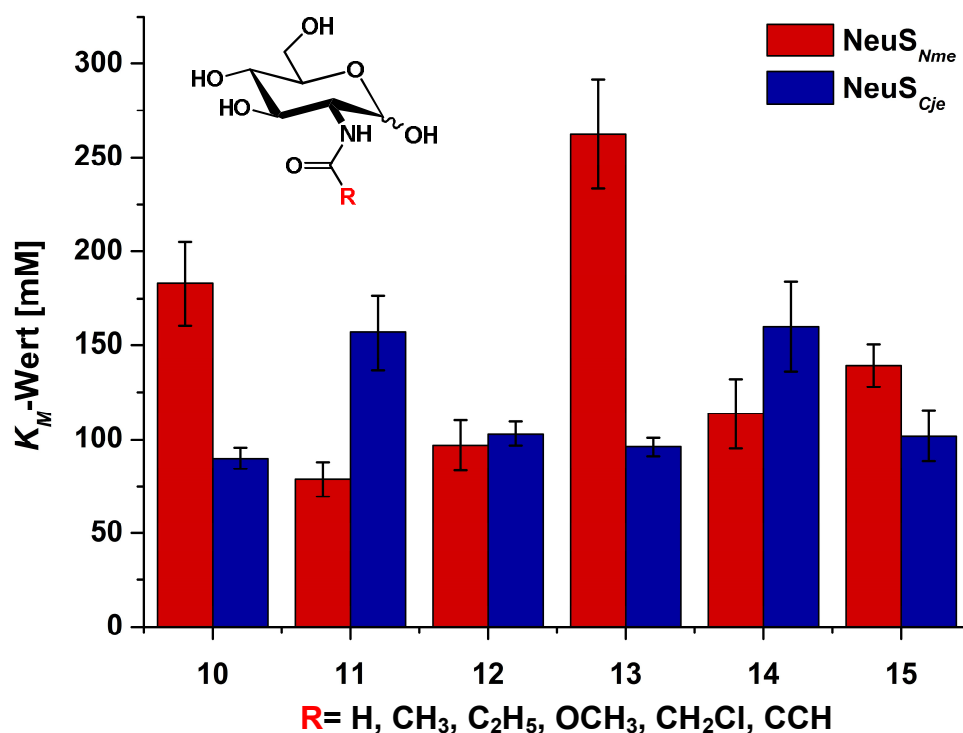
	Küvette [V <sub>R</sub> = 300µl]	96-Lochplatte [V <sub>R</sub> = 200µl]
Substrat	0-300 mM	0-300 mM
PEP [1 M]	1,5 µl	1 µl
Synthase <sup>[a]</sup>	0-400 µg	0-400 µg
LDH [1 U/µl]	1 µl	1 µl
NeuA [1 U/µl]	10 µl	10 µl
DTT [100 mM]	3 µl	3 µl
NADH [10 mM]	7,5 µl	7,5 µl
Bicin pH 8,0 <sup>[b]</sup>	Ad 300µl	Ad 200µl

<sup>[a]</sup> c(NeuS<sub>Nme</sub>)= 5 mg/ml und c(NeuS<sub>Cje</sub>)= 20 mg/ml; <sup>[b]</sup> 50 mM Bicin pH 8,0 mit 10 mM MnCl<sub>2</sub>

Beim Übergang von Küvette auf Lochplatte wurde das Volumen nochmals von 300 µl auf 200 µl verringert. Dies bietet einige Vorteile, da die Menge an den meist teuren Substraten für die Messungen und die Mengen der jeweiligen Enzyme verringert werden können. Das Verwenden von 96-Lochplatten bringt des Weiteren einen großen Zeitvorteil, da man bei guter Planung bis zu 3 Messdatenreihen pro Platte messen kann.

Die relativen Mengen und Konzentrationen der einzelnen Komponenten, ausschließlich der zu vermessenden Substrate und eingesetzten Synthase, wurde beim Übergang auf das kleinere System beibehalten. Der Konzentrationsbereich für die Glucosaminderivate **10-15** bei den kinetischen Messungen lag, je nach Art des Substrates, zwischen 0-300 mM. Die Menge an eingesetzter Synthase blieb bei den Küvettenmessungen identisch zu den früheren Messungen. Für Messungen in 96-Lochplatten wurden die Mengen um die Hälfte reduziert. Der Hintergrund für diese Reduzierung war die Vermutung, dass mit der Enzymmenge die in den Küvetten eingesetzt wird, die Reaktion mit den Glucosaminderivaten **10-15** in den Platten zu schnell werden und die gemessenen Kurven nicht auswertbar sein könnten. Im Plattenphotometer wurde in einem Intervall von zehn Sekunden die Absorptionsabnahme in den Proben gemessen. Dadurch wurden die Messkurven im Vergleich zu den Küvettenbestimmungen etwas gröber. Von allen Glucosaminderivaten **10-15** konnten gute

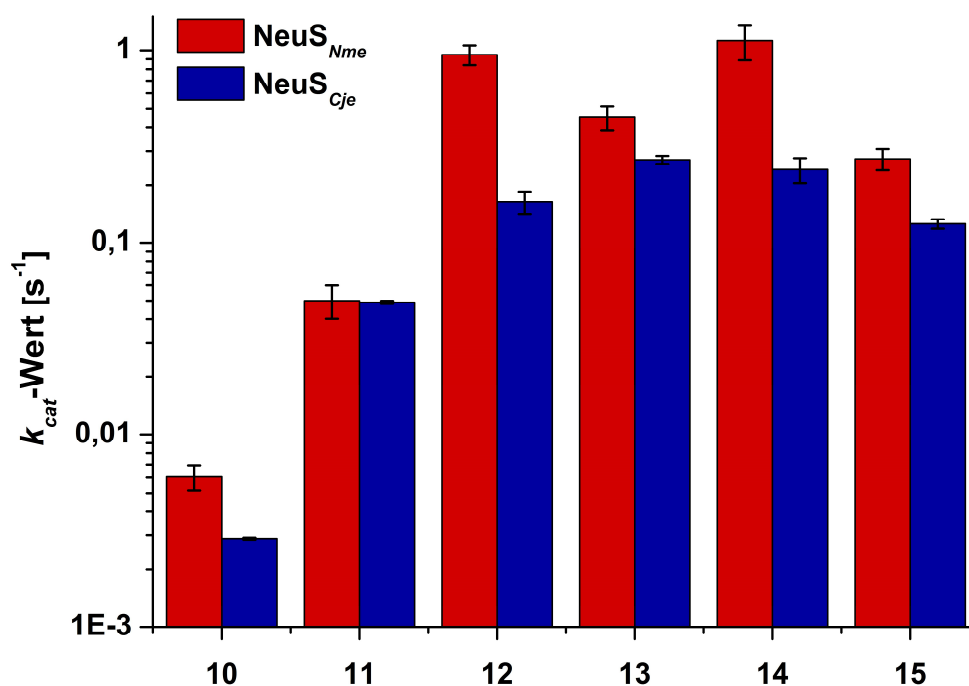
Sättigungskurven ermittelt werden. In Abbildung 3.20 sind die resultierenden  $K_M$ -Werte der beiden Synthesen für die Glucosaminderivate im Vergleich dargestellt.



**Abbildung 3.20:**  $K_M$ -Werte der beiden Synthesen NeuS<sub>Nme</sub> und NeuS<sub>Cje</sub> gegenüber den *N*-modifizierten Glucosaminderivaten **10** bis **15**.

Beide *N*-Acetylneuraminsäuresynthesen NeuS<sub>Nme</sub> und NeuS<sub>Cje</sub> akzeptieren die vermessenen Glucosaminderivate als Substrate. Im Vergleich der beiden Synthesen untereinander liegen die Affinitäten zu den Glucosaminderivaten im gleichen Größenbereich. Dabei zeigt die NeuS<sub>Nme</sub> eine größere Affinität zu den Substraten *N*-Acetylglucosamin **10**, *N*-Methoxycarbonylglucosamin **13** und *N*-Propinoylglucosamin **15**, die NeuS<sub>Cje</sub> dagegen eine größere Affinität zu den Substraten *N*-Formylglucosamin **11** und *N*-Chloracetylglucosamin **14**. Den größten Unterschied in der Substrataffinität zeigen die beiden Synthesen für *N*-Acetylglucosamin **10** und *N*-Methoxycarbonylglucosamin **13**. Die Auswirkung der konfigurativen Änderung an C2-Atom von der *manno*- in die *gluco*-Konfiguration macht sich bei beiden Synthesen mit einem Affinitätsverlust um zweieinhalb bis drei Größenordnungen im Vergleich zum natürlichen Substrat *N*-Acetylmannosamin **2** und dessen Derivaten bemerkbar. Sehr deutlich wird das bei den Substraten *N*-Acetylglucosamin **10** und *N*-Chloracetylglucosamin **14**. Liegt für NeuS<sub>Nme</sub> der  $K_M$ -Wert vom *N*-Chloracetylderivat in der *manno*-Konfiguration bei 0,25 mM, so verschlechtert er sich durch den Übergang in die

*gluco*-Konfiguration auf 114 mM. Selbst für den konfigurativen Wechsel an C-2 Position von *N*-Acetylmannosamin **2** zu *N*-Acetylglucosamin **10** ohne Seitenkettenmodifikation sinkt die Affinität vor allem bei NeuS<sub>Nme</sub>. Dies ist im Anstieg des  $K_M$ -Wertes von 0,49 mM auf 184 mM sehr deutlich zu erkennen. Abbildung 3.21 zeigt die Aktivität der beiden *N*-Acetylneuraminsäuresynthasen NeuS<sub>Nme</sub> und NeuS<sub>Cje</sub> gegenüber den Glucosaminderivaten.

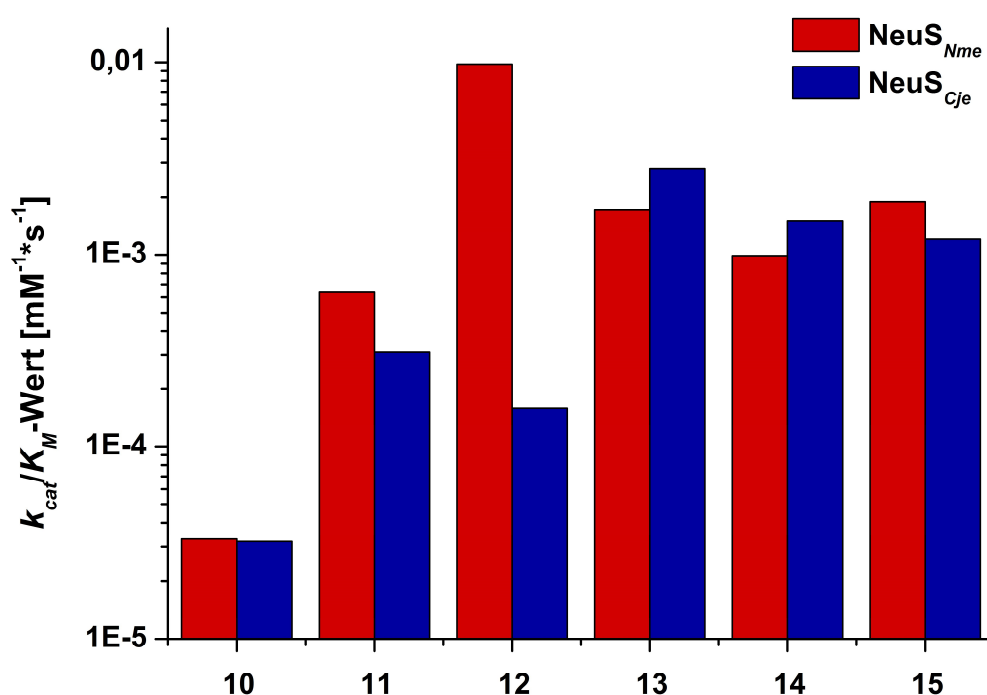


**Abbildung 3.21:** Vergleich der molekularen Aktivität ( $k_{cat}$ -Wert) der beiden *N*-Acetylneuraminsäuresynthasen NeuS<sub>Nme</sub> und NeuS<sub>Cje</sub> mit den jeweiligen *N*-acylierten Glucosaminderivaten **10-15**.

Die  $k_{cat}$ -Werte der Glucosaminderivate **10-15** liegen für beide Synthasen in der gleichen Größenordnung, jedoch sind die molekularen Aktivitäten für NeuS<sub>Nme</sub> um einen Faktor zwei bis drei höher im Vergleich zu denen der NeuS<sub>Cje</sub>. Den größten Unterschied in der Wechselzahl und somit in der Effizienz und Geschwindigkeit der katalysierten Reaktion findet sich für die beiden Substrate *N*-Propanoylglucosamin **12** und *N*-Chloracetylglucosamin **14**. Die Kettenverlängerung und das Einfügen eines sterisch anspruchsvollen elektronegativen Chloratoms auch in der unnatürlichen *gluco*-Konfiguration wirken sich bei NeuS<sub>Nme</sub> positiv auf die Effizienz der Synthase aus.

Vergleicht man die Effizienz der beiden Synthasen zwischen den *manno*- und den *gluco*-konfigurierten Derivaten und dem natürlichen Substrat, liegen die relativen

molekularen Aktivitäten fast alle in der gleichen Größenordnung. Ausnahmen sind *N*-Acetylglucosamin **10**, dessen  $k_{cat}$ -Werte für beide Synthasen um zwei Größenordnungen niedriger liegen im Vergleich zu dem natürlichen Substrat *N*-Acetylmannosamin **2** und *N*-Chloracetylglucosamin **14**. Beim *N*-Chloracetylglucosamin **14** ist die Effizienz der beiden Synthasen gegenläufig im Vergleich zum *N*-Chloracetylmannosamin **6**. NeuS<sub>Nme</sub> hat eine um etwa eine Größenordnung höhere molekulare Aktivität zu *N*-Chloracetylglucosamin **14** als zu dem entsprechenden *N*-Chloracetylmannosamin **6**. Für die NeuS<sub>Cje</sub> ist es umgekehrt, hier ist die Effizienz des Enzyms zu *N*-Chloracetylglucosamin **14** um einen Faktor vier schlechter im Vergleich zu *N*-Chloracetylmannosamin **6**.



**Abbildung 3.22:** Vergleich der katalytischen Effizienz ( $k_{cat}/K_M$ ) der beiden *N*-Acetylneuraminsäuresynthasen NeuS<sub>Nme</sub> und NeuS<sub>Cje</sub> gegenüber den jeweiligen *N*-modifizierten Glucosaminderivaten **10-15**. Für den besseren Vergleich ist die Darstellung hier logarithmisch gewählt.

Die katalytische Effizienz der beiden Synthasen NeuS<sub>Nme</sub> und NeuS<sub>Cje</sub> zu den Glucosaminderivaten **10-15** ist nahezu identisch (Abbildung 3.22). Die schlechteste Substratspezifität besitzen beide Enzyme für *N*-Acetylglucosamin **10**, diese liegen mit 3,3\*10<sup>-5</sup>/mM<sup>-1</sup>\*s<sup>-1</sup> für NeuS<sub>Nme</sub> und mit 3,2\*10<sup>-5</sup>/mM<sup>-1</sup>\*s<sup>-1</sup> für NeuS<sub>Cje</sub>, um eine bis zwei Größenordnungen niedriger als bei den restlichen Glucosaminderivaten. Die beste katalytische Effizienz zeigt NeuS<sub>Nme</sub> mit 9,8\*10<sup>-3</sup>/mM<sup>-1</sup>\*s<sup>-1</sup> gegenüber dem

---

*N*-Propanoylglucosamin **12** als Substrat. Hierin unterscheidet sich die NeuS<sub>Nme</sub> deutlich von NeuS<sub>Cje</sub>, da ihre Substratspezifität für *N*-Propanoylglucosamin **12** mit  $1,6 \cdot 10^{-4} / \text{mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  um eine Größenordnung geringer ist. Die katalytische Effizienz zu den Substraten mit einem weiteren Heteroatom **13** und **14** oder einer Funktionalisierung mit einem terminalen Alkin **15** in der Seitenkette sind bei beiden Synthesen fast gleich. Eine Verkürzung der Seitenkette vom *N*-Acetylderivat zum *N*-Formylderivat **11** lässt die Substratspezifität um eine Größenordnung sinken.

Vergleicht man die Substratspezifität der beiden Synthesen zwischen den Mannosamin- und den Glucosaminderivaten, werden schon extremere Unterschiede deutlich. Waren die Unterschiede in der Affinität und Effizienz von NeuS<sub>Nme</sub> zu *N*-Chloracetylmannosamin **6** und *N*-Chloracetylglucosamin **14** relativ gering, liegt der Unterschied in der katalytischen Effizienz nun bei drei Größenordnungen. Besitzt die Synthase zu *N*-Chloracetylmannosamin **6** eine katalytische Effizienz von  $1,88 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ , liegt sie für *N*-Chloracetylglucosamin **14** nur noch bei  $9,9 \cdot 10^{-4} \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ . Einen noch stärkeren Abfall der katalytischen Effizienz bringt der konfigurative Wechsel an C2-Position von *N*-Acetylmannosamin **2** zu *N*-Acetylglucosamin **10** für NeuS<sub>Nme</sub> von  $1,53 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  auf  $3,3 \cdot 10^{-5} \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  mit sich und bei NeuS<sub>Cje</sub> von  $2,3 \cdot 10^{-1} \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  auf  $3,2 \cdot 10^{-5} \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ .

Bei allen anderen Substitutionsmustern liegt die katalytische Effizienz der beiden Synthesen für die Glucosaminderivate bis zu zwei Größenordnungen niedriger als zu den entsprechenden Mannosaminderivaten. Untereinander unterscheiden sich die beiden Synthesen in ihrer Substratspezifität gegenüber Glucosaminderivaten kaum. Alle kinetischen Konstanten für die Glucosaminderivaten sind in Tabelle 3.19 aufgelistet.



**Tabelle 3.19:** Affinität, Aktivität, katalytische Effizienz und massenspezifische Aktivität der beiden *N*-Acetylneuraminsäuresynthasen NeuS<sub>Nme</sub> und NeuS<sub>Cje</sub> gegenüber den Substraten **10-15** sowie dem natürlichen Substrat *N*-Acetylmannosamin **2** im Überblick.

NeuS <sub>Nme</sub>				
	$K_M$ [mM]	$k_{cat}$ [s <sup>-1</sup> ]	$k_{cat}/K_M$ [mM <sup>-1</sup> *s <sup>-1</sup> ]	U/mg
<b>2</b>	0,5±0,02	7,5*10 <sup>-1</sup> ±1,0*10 <sup>-2</sup>	1,53	3,94
<b>10</b>	183±22,4	6,1*10 <sup>-3</sup> ±8,9*10 <sup>-4</sup>	3,3*10 <sup>-5</sup>	1,9*10 <sup>-1</sup>
<b>11</b>	79±9,1	5,0*10 <sup>-2</sup> ±1,0*10 <sup>-3</sup>	6,4*10 <sup>-4</sup>	2,6*10 <sup>-1</sup>
<b>12</b>	97±13,4	9,5*10 <sup>-1</sup> ±1,1*10 <sup>-1</sup>	9,8*10 <sup>-3</sup>	4,96
<b>13</b>	263±29,0	4,5*10 <sup>-1</sup> ±6,4*10 <sup>-2</sup>	1,7*10 <sup>-3</sup>	2,35
<b>14</b>	114±18,5	1,12±2,3*10 <sup>-1</sup>	9,9*10 <sup>-4</sup>	5,89
<b>15</b>	139±11,2	2,7*10 <sup>-1</sup> ±3,5*10 <sup>-2</sup>	1,9*10 <sup>-3</sup>	1,42

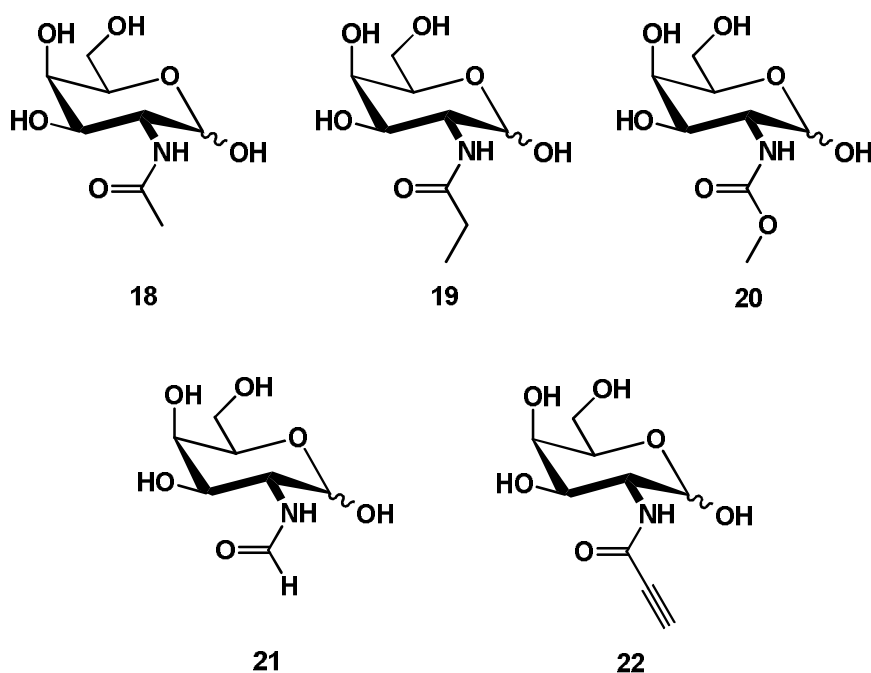
NeuS <sub>Cje</sub>				
	$K_M$ [mM]	$k_{cat}$ [s <sup>-1</sup> ]	$k_{cat}/K_M$ [mM <sup>-1</sup> *s <sup>-1</sup> ]	U/mg
<b>2</b>	0,7±0,03	1,6*10 <sup>-1</sup> ±2,0*10 <sup>-2</sup>	2,3*10 <sup>-1</sup>	3,32
<b>10</b>	90±5,7	2,9*10 <sup>-3</sup> ±3,3*10 <sup>-5</sup>	3,2*10 <sup>-5</sup>	8,9*10 <sup>-2</sup>
<b>11</b>	157±19,9	4,9*10 <sup>-2</sup> ±8,8*10 <sup>-4</sup>	3,1*10 <sup>-4</sup>	2,5*10 <sup>-1</sup>
<b>12</b>	103±6,4	1,6*10 <sup>-1</sup> ±2,2*10 <sup>-2</sup>	1,6*10 <sup>-4</sup>	8,5*10 <sup>-1</sup>
<b>13</b>	96±5,1	2,7*10 <sup>-1</sup> ±1,3*10 <sup>-2</sup>	2,8*10 <sup>-3</sup>	3,5*10 <sup>-1</sup>
<b>14</b>	160±23,8	2,4*10 <sup>-1</sup> ±3,5*10 <sup>-2</sup>	1,5*10 <sup>-3</sup>	1,21
<b>15</b>	102±13,5	1,3*10 <sup>-1</sup> ±7,0*10 <sup>-3</sup>	1,2*10 <sup>-3</sup>	6,5*10 <sup>-1</sup>

Aufgrund dieser kinetischen Daten lässt sich sagen, dass beide *N*-Acetylneuraminsäuresynthasen NeuS<sub>Nme</sub> und NeuS<sub>Cje</sub> relativ flexibel in der Substrattoleranz sind, was konfigurative Änderungen am C2-Kohlenstoffatom des *N*-modifizierten Aminosuckers betrifft. Die *N*-Acetylneuraminsäuresynthase NeuS<sub>Nme</sub> erweist sich bezüglich der Affinität und Aktivität gegenüber den Glucosaminderivaten als die bessere Synthase. Am besten toleriert werden Substrate in der natürlichen *manno*-Konfiguration, aber auch mit der *gluco*-Konfiguration können beide Synthasen, mit sinkender katalytischer Effizienz, arbeiten und verbreitern somit das Spektrum an neuen Substraten für die Synthese neuer interessanter Neuraminsäurederivate. Im Rahmen seiner Bachelorarbeit hat Jäger<sup>[83]</sup> in unserer Arbeitsgruppe auch in präparativen Synthesen gezeigt, dass sich die beiden

Glucosaminderivate *N*-Methoxycarbonylglucosamin **13** und *N*-Chloracetylglucosamin **15** mit der NeuS<sub>Nme</sub> zu den entsprechenden Neuraminsäurederivaten umsetzen lassen.

### 3.4.7 Bestimmung der kinetischen Konstanten *N*-acylierter Galactosaminderivate mit den beiden Synthasen NeuS<sub>Nme</sub> und NeuS<sub>Cje</sub>

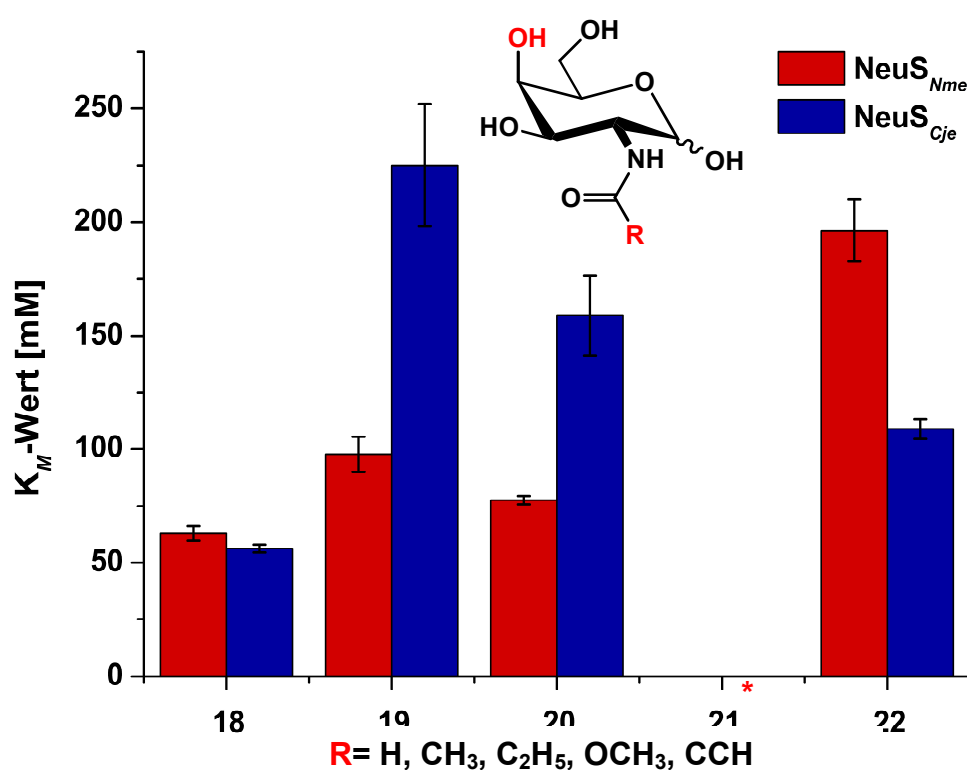
Der logische nächste Schritt in der kinetischen Untersuchung der beiden Neuraminsäuresynthasen ist, die Auswirkung einer weiteren konfigurativen Änderung in der Substratstruktur auch an der C4-Position zu untersuchen und somit die Toleranz der Synthasen gegenüber Substraten mit *galacto*-Konfiguration zu bestimmen. Als Substrate für die Untersuchung wurden die in Abbildung 3.23 gelisteten *N*-modifizierten Galactosaminderivate **18-22** eingesetzt.



**Abbildung 3.23:** *N*-acylierte Galactosaminderivate **18-22** als potentielle Substrate für die kinetischen Untersuchungen von NeuS<sub>Nme</sub> und NeuS<sub>Cje</sub>.

Die kinetischen Messungen wurden für die Galactosaminderivate **18-22** ebenfalls in der miniaturisierten Version in 96-Lochplatten durchgeführt. Der Konzentrationsbereich für die Messungen wurde je nach Substrat zwischen 0-500 mM gewählt. Die Mengen und Konzentrationen aller anderen Komponenten wurde analog zu den Messungen mit den

Mannosamin- und Glucosaminderivaten gewählt. Für jede vermessene Konzentration eines der Galactosaminderivate, sowie für die Positiv- und Negativkontrolle, wurde wiederum eine Dreifachbestimmung durchgeführt. Durch die relativ zum natürlichen Substrat doppelte konfigurative Änderung an C2/C4-Position und dem daraus resultierenden langsameren Reaktionsverlauf wurden die Messzeiten auf bis zu drei Stunden verlängert. Die aus den Sättigungskurven der jeweiligen Messdatenreihen ermittelten  $K_M$ -Werte für die einzelnen Galactosaminderivate **18-22** sind in Abbildung 3.24 im Überblick dargestellt. Für alle vermessenen Derivate, mit Ausnahme von **21**, konnten mit beiden Synthasen NeuS<sub>Nme</sub> und NeuS<sub>Cje</sub> eindeutige Messkurven erhalten werden.

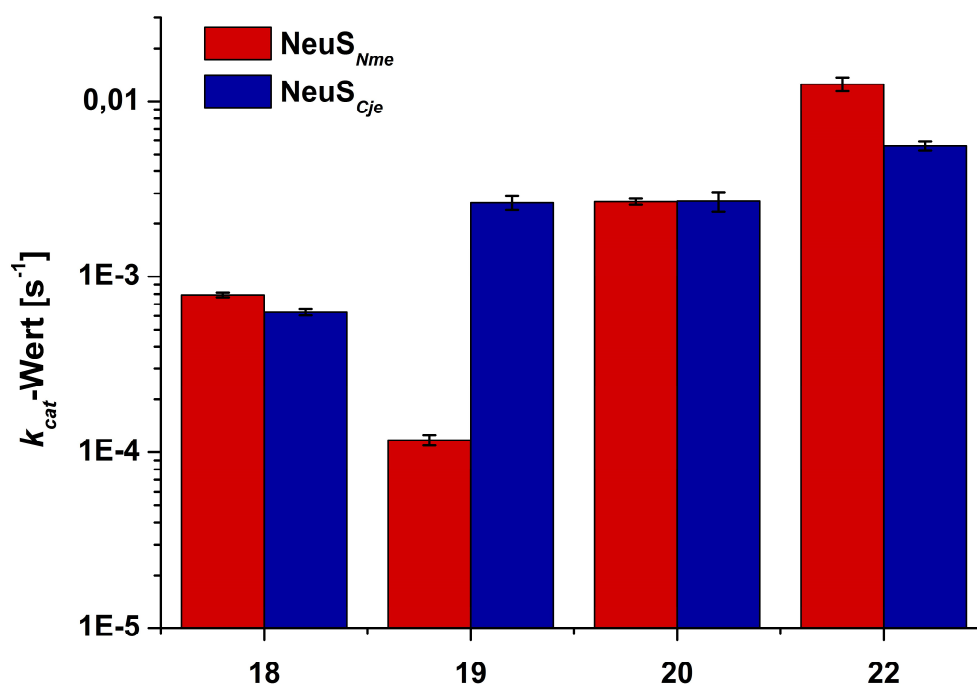


**Abbildung 3.24:**  $K_M$ -Werte der beiden Synthasen NeuS<sub>Nme</sub> und NeuS<sub>Cje</sub> gegenüber den *N*-modifizierten Galactosaminderivaten **18** bis **22**. \* Für Substrat **21** konnten trotz mehrerer Versuche keine auswertbaren Kurven gemessen werden.

Für *N*-Acetylgalactosamin **18**, welches bis auf die konfigurativen Änderungen an C2 und C4 sowie dem Fehlen der zweiten Acetamidogruppe dem natürlichen Substrat am ähnlichsten ist, besitzen beide Synthasen vergleichbare Affinität. Für die NeuS<sub>Nme</sub> beträgt der  $K_M$ -Wert 63 mM und für die NeuS<sub>Cje</sub> 56 mM. Bei den anderen vermessenen Galactosaminderivaten unterscheiden sich die Affinitäten der beiden Synthasen für die einzelnen Substrate jedoch merklich. NeuS<sub>Nme</sub> besitzt für *N*-Methoxycarbonylgalactosamin **20** einen  $K_M$ -Wert von

78 mM und bei *N*-Propanoylgalactosamin **19** liegt der  $K_M$ -Wert bei 98 mM. Gegenüber *N*-Propinoylgalactosamin **22** besitzt die NeuS<sub>Nme</sub> eine um den Faktor drei geringere Affinität. Im Vergleich dazu sind die  $K_M$ -Werte der NeuS<sub>Cje</sub> für diese drei Galactosaminderivate um den Faktor drei bis fünf größer, was gleichbedeutend ist mit einer geringeren Affinität des Enzyms zu diesen Substraten. Mit einem  $K_M$ -Wert von 109 mM ist *N*-Propanoylgalactosamin **19** neben *N*-Acetylgalactosamin **18** das Substrat für das NeuS<sub>Cje</sub> in der Gruppe der Galactosaminderivate die beste Affinität besitzt.

Die  $K_M$ -Werte der Galactosaminderivate für beide Synthasen liegen in der gleichen Größenordnung wie die der Glucosaminderivate. Somit besitzen NeuS<sub>Nme</sub> und NeuS<sub>Cje</sub> eine im Vergleich zu den *N*-modifizierten Mannosaminderivaten um eine Größenordnung schlechtere Affinität zu den *galacto*-konfigurierten *N*-modifizierten Substraten.

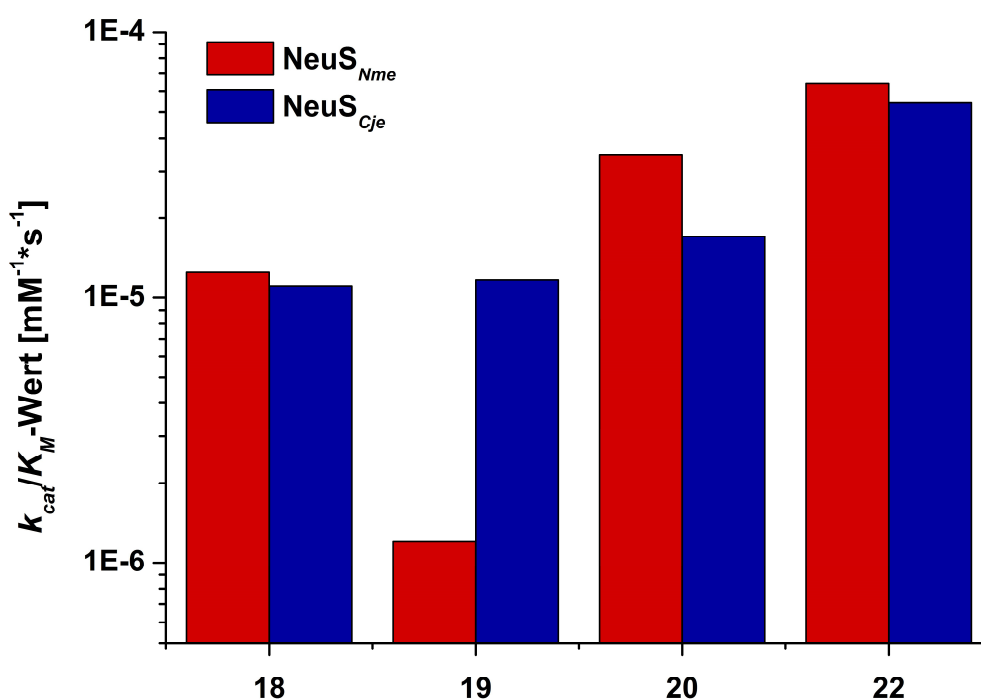


**Abbildung 3.25:** Vergleich der molekularen Aktivität ( $k_{cat}$ -Wert) der beiden *N*-Acetylneuraminsäuresynthasen NeuS<sub>Nme</sub> und NeuS<sub>Cje</sub> mit den jeweiligen *N*-acylierten Galactosaminderivaten **18-22**. Für den besseren Vergleich ist die Darstellung hier logarithmisch gewählt.

Die katalytische Leistungsfähigkeit der beiden Synthasen gegenüber den Galactosaminderivaten (Abbildung 3.25) ist annähernd gleich. Die beste molekulare Aktivität zeigt NeuS<sub>Nme</sub> mit  $1,2 \cdot 10^{-2}/s$  für *N*-Propinoylderivat **22**, auch für NeuS<sub>Cje</sub> ist die katalytische

Leistungsfähigkeit gegenüber diesem Substrat am Besten, mit  $5,6 \cdot 10^{-3}/s$  jedoch um einen Faktor zwei geringer. Den größten Unterschied in der molekularen Aktivität zeigen die beiden Enzyme für das *N*-Propanoylgalactosamin **19**. Liegt der  $k_{cat}$ -Wert für dieses Substrat bei NeuS<sub>Nme</sub> nur bei  $1,2 \cdot 10^{-4}/s$ , ist er bei NeuS<sub>Cje</sub> mit  $2,6 \cdot 10^{-3}/s$  um eine Größenordnung besser. Für die beiden anderen Substrate besitzen die Synthasen die gleiche katalytische Leistungsfähigkeit, dabei ist *N*-Methoxycarbonylgalactosamin **20** gegenüber *N*-Acetylgalactosamin **18** das bessere Substrat. NeuS<sub>Cje</sub> zeigt für *N*-Acetylgalactosamin **18** mit  $6,3 \cdot 10^{-4}/s$  die schlechteste katalytische Leistungsfähigkeit in der Gruppe der *N*-modifizierten Galactosaminderivate.

Im Vergleich der  $k_{cat}$ -Werte zwischen den *gluco*- und den *galacto*-konfigurierten Substraten sinkt die katalytische Leistungsfähigkeit der beiden Synthasen durch die zusätzliche Konfigurationsänderung am C4-Atom um eine Größenordnung ab. Durch die doppelte konfigurative Änderung an C2- und C4-Position liegt die molekulare Aktivität zwei bis drei Größenordnungen unter der, die mit den *manno*-konfigurierten Substraten mit den Synthasen erreicht werden.



**Abbildung 3.26:** Katalytischen Effizienz ( $k_{cat}/K_M$ ) der beiden *N*-Acetylneuraminsäuresynthasen NeuS<sub>Nme</sub> und NeuS<sub>Cje</sub> gegenüber den *N*-modifizierten Galactosaminderivaten **18-22**. Für den besseren Vergleich ist die Darstellung hier logarithmisch gewählt.

---

Die katalytische Effizienz der Synthasen NeuS<sub>Nme</sub> und NeuS<sub>Cje</sub> gegenüber den *N*-acylierten Galactosaminderivaten ist nahezu identisch (Abbildung 3.26). Die beste Substratspezifität zeigen sie gegenüber dem *N*-Acetylgalactosamin **18**. Diese ist für NeuS<sub>Nme</sub>  $1,3 \cdot 10^{-5} \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  und für NeuS<sub>Cje</sub> bei  $1,1 \cdot 10^{-5} \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ . Während die katalytischen Effizienzen von NeuS<sub>Cje</sub> in dieser Gruppe von Galactosaminderivaten alle in der gleichen Größenordnung wie *N*-Acetylgalactosamin **18** liegen, sinkt die katalytische Effizienz der NeuS<sub>Nme</sub> gegenüber *N*-Propanoylgalactosamin **19** überraschend um eine ganze Größenordnung auf  $1,2 \cdot 10^{-6} \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  ab. Im Vergleich der katalytischen Effizienz der beiden Synthasen NeuS<sub>Nme</sub> und NeuS<sub>Cje</sub> mit den Glucosamin und den Galactosaminderivaten ist diese gegenüber den Galactosaminderivaten um zwei Größenordnungen niedriger. Lag die katalytische Effizienz von NeuS<sub>Nme</sub> gegenüber *N*-Methoxycarbonylglucosamin **13** noch bei  $1,7 \cdot 10^{-3} \text{ Mm}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ , sinkt sie bei dem entsprechenden Galactosaminderivat **18** auf  $3,5 \cdot 10^{-5} \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ . Noch deutlicher wird der Abfall der katalytischen Effizienz beim Vergleich mit den *N*-acylierten Mannosaminderivaten, hier liegen vier bis fünf Größenordnung dazwischen. Tabelle 3.20 fasst die kinetischen Daten der Galactosaminderivate 18-22 summarisch zusammen.

**Tabelle 3.20:** Affinität, Aktivität, katalytische Effizienz und massenspezifische Aktivität der beiden *N*-Acetylneuraminsäuresynthasen NeuS<sub>Nme</sub> und NeuS<sub>Cje</sub> gegenüber den Substraten **18-22** sowie dem natürlichen Substrat *N*-Acetylmannosamin **2** im Überblick.

NeuS <sub>Nme</sub>				
	$K_M$ [mM]	$k_{cat}$ [s <sup>-1</sup> ]	$k_{cat}/K_M$ [mM <sup>-1</sup> *s <sup>-1</sup> ]	U/mg
<b>2</b>	0,49±0,02	7,5*10 <sup>-1</sup> ±1,0*10 <sup>-2</sup>	1,53	3,94
<b>18</b>	63±3,2	7,9*10 <sup>-4</sup> ±2,4*10 <sup>-5</sup>	1,3*10 <sup>-5</sup>	4,9*10 <sup>-2</sup>
<b>19</b>	98±7,8	1,2*10 <sup>-4</sup> ±8,2*10 <sup>-6</sup>	1,2*10 <sup>-6</sup>	9,2*10 <sup>-2</sup>
<b>20</b>	78±1,8	2,7*10 <sup>-3</sup> ±1,1*10 <sup>-4</sup>	3,5*10 <sup>-5</sup>	2,0*10 <sup>-2</sup>
<b>22</b>	196±13,8	1,3*10 <sup>-2</sup> ±1,1*10 <sup>-3</sup>	6,4*10 <sup>-5</sup>	9,8*10 <sup>-2</sup>

NeuS <sub>Cje</sub>				
	$K_M$ [mM]	$k_{cat}$ [s <sup>-1</sup> ]	$k_{cat}/K_M$ [mM <sup>-1</sup> *s <sup>-1</sup> ]	U/mg
<b>2</b>	0,69±0,03	1,6*10 <sup>-1</sup> ±2,0*10 <sup>-2</sup>	2,3*10 <sup>-1</sup>	3,32
<b>18</b>	56±1,7	6,3*10 <sup>-4</sup> ±2,5*10 <sup>-5</sup>	1,1*10 <sup>-5</sup>	2,0*10 <sup>-2</sup>
<b>19</b>	225±26,9	2,6*10 <sup>-3</sup> ±2,4*10 <sup>-4</sup>	1,2*10 <sup>-5</sup>	2,1*10 <sup>-2</sup>
<b>20</b>	159±17,5	2,7*10 <sup>-3</sup> ±3,5*10 <sup>-4</sup>	1,7*10 <sup>-5</sup>	2,1*10 <sup>-2</sup>
<b>22</b>	109±4,4	5,6*10 <sup>-3</sup> ±3,3*10 <sup>-4</sup>	5,1*10 <sup>-5</sup>	4,4*10 <sup>-2</sup>

Die *N*-Acetylneuraminsäuresynthasen NeuS<sub>Nme</sub> und NeuS<sub>Cje</sub> erweisen sich als sehr flexibel, nicht nur im Hinblick auf Substitutionen in der Seitenkette von Mannosaminderivaten. Sie akzeptieren auch konfigurative Modifikation an den Kohlenstoffatomen C2 und C4. Auch wenn man sich mit jeder Konfigurationsänderung weiter von der Struktur des natürlichen Substrates entfernt, was sich sehr deutlich in den immer schlechter werdenden kinetischen Daten widerspiegelt, hat man mit den beiden Synthasen offenbar doch potente Werkzeuge in der Hand, die eine präparativinteressante Substrattoleranz besitzen.

### 3.4.8 Bestimmung der kinetischen Konstanten von weiteren ausgewählten Zuckern mit den beiden *N*-Acetylneuraminsäuresynthasen NeuS<sub>Nme</sub> und NeuS<sub>Cje</sub>

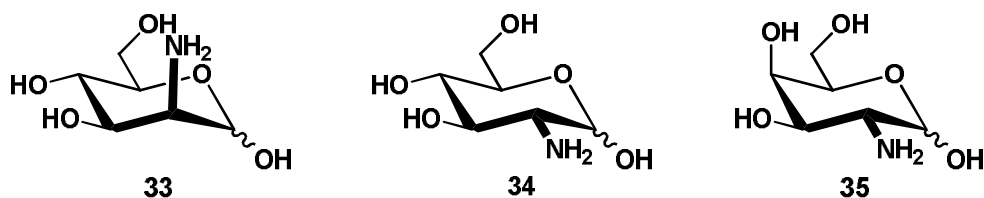
Um die Möglichkeiten und Fähigkeiten die diese Synthasen besitzen weiter zu erforschen, wurden weitere potentielle Substrate in den Fokus der kinetischen Untersuchungen gerückt. Der Auswahl dieser potentiellen Substrate lagen die folgenden Fragestellungen zu Grunde:

„Ist die Amidgruppe an der C2-Position essentiell für die Aktivität der Synthasen?“

„Wie verhalten sich die Synthasen gegenüber Aminozucker, normalen Zucker, Deoxyzuckern (2-Deoxy und 6-Deoxy) und Pentosen?“

„Wird eine konfigurative Änderung auch an C3-Position von den Synthase akzeptiert?“

Die in Abbildung 3.27 gezeigten potentiellen Substrate sollten zunächst die Frage beantworten: „Ist eine Amidgruppe für die katalytische Aktivität der *N*-Acetylneuraminsäuresynthasen NeuS<sub>Nme</sub> und NeuS<sub>Cje</sub> essentiell?“.



**Abbildung 3.27:** Für kinetische Untersuchungen von NeuS<sub>Nme</sub> und NeuS<sub>Cje</sub> als Substrate eingesetzten freien Aminozucker 33-35.

Alle kinetischen Untersuchungen mit den Aminozuckern wurden wieder im 96-Lochplatten-Format durchgeführt. Die erste Messreihe mit jedem Aminozucker wurde zunächst im Konzentrationsbereich von 0-500 mM an Substrat und langen Messzeiten vermessen, da es Anhaltspunkte für die Eignung der Aminozucker als Substrate der beiden Synthasen NeuS<sub>Nme</sub> und NeuS<sub>Cje</sub> gab (Tabelle 3.21).



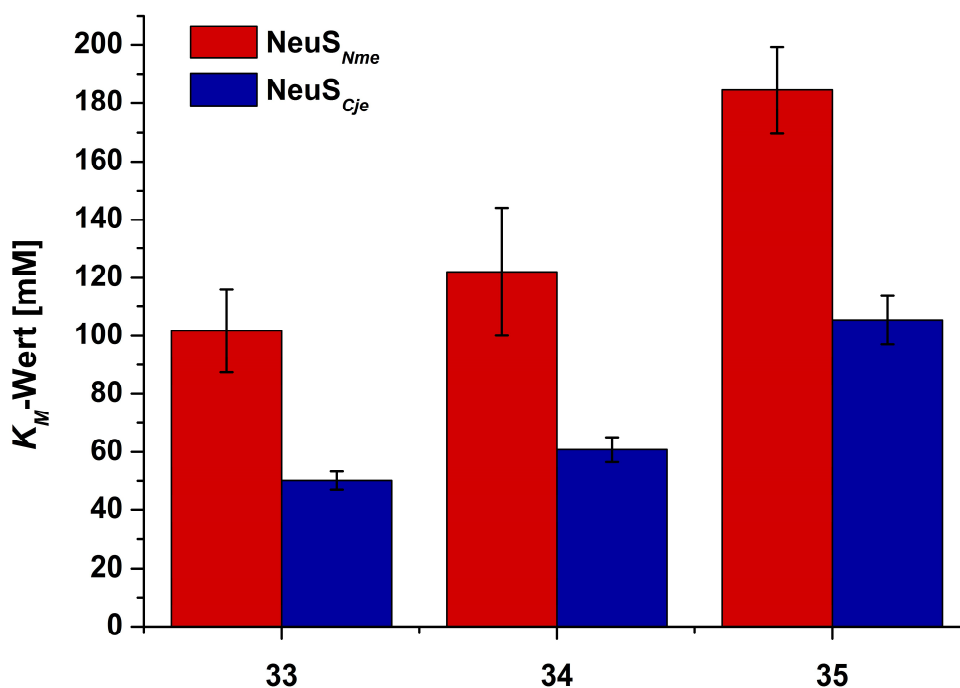
**Tabelle 3.21:** Ansatzgrößen zur Bestimmung der kinetischen Daten der Aminosucker **33-35** für Messungen in der 96-Lochplatte. Wichtigste Änderungen gegenüber vorherigen Messungen waren die Verwendung höherer Konzentration der Substrate und größere Enzymmengen, sowie längere Messzeiten.

96-Lochplatte [ $V_R = 200\mu\text{l}$ ]	
Aminosucker	0-500 mM
PEP [1 M]	1 $\mu\text{l}$
Synthase <sup>[a]</sup>	0-400 $\mu\text{g}$
LDH [1 U/ $\mu\text{l}$ ]	1 $\mu\text{l}$
NeuA [1 U/ $\mu\text{l}$ ]	10 $\mu\text{l}$
DTT [100 mM]	3 $\mu\text{l}$
NADH [10 mM]	7,5 $\mu\text{l}$
Bicin pH 8,0 <sup>[b]</sup>	Ad 200 $\mu\text{l}$

<sup>[a]</sup>  $c(\text{NeuS}_{Nme}) = 5 \text{ mg/ml}$  und  $c(\text{NeuS}_{Cje}) = 20 \text{ mg/ml}$ ; <sup>[b]</sup> 50 mM Bicin pH 8,0 mit 10 mM  $\text{MnCl}_2$ .

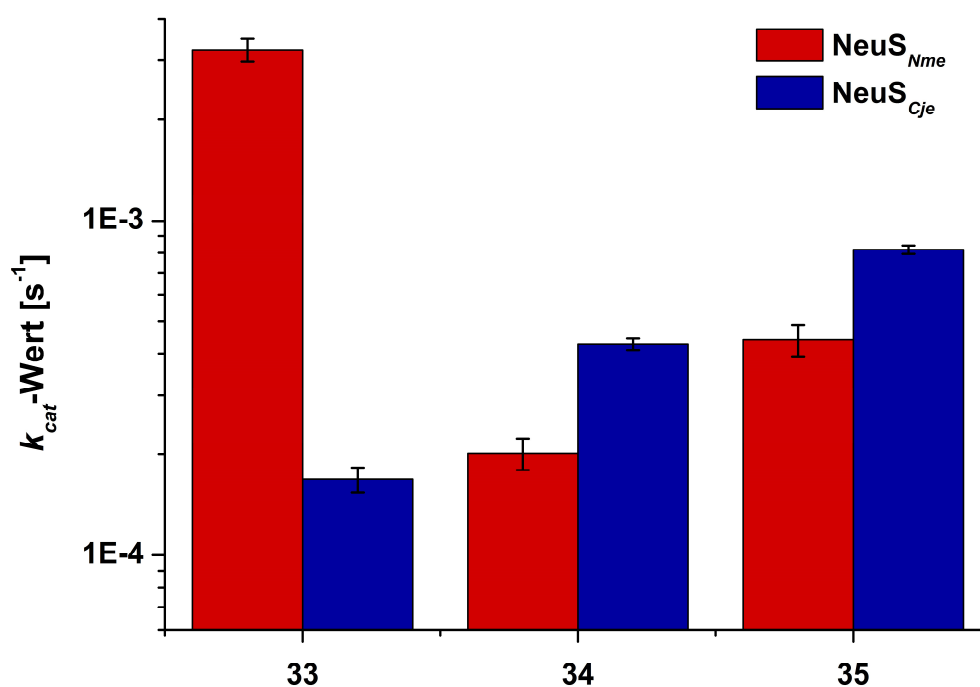
Die Menge an eingesetzter Synthase wurde für diese ersten Messungen auf 400  $\mu\text{g}$  pro Ansatz erhöht und die Messzeiten verlängert. Mit einer Konzentration von 500 mM Aminosucker erreicht man allerdings langsam die Grenzen des Machbaren bezüglich des zur Verfügung stehenden Volumens und der Löslichkeit der Zucker. Da die Aminosucker **33-35** in Form ihrer Hydrochloride eingesetzt wurden, könnte dies einen zusätzlichen Einfluß auf den Assay und somit auf die Aktivität der Synthasen haben. Da mit steigender Konzentration der Aminosucker auch die Konzentration der in Lösung befindlichen Chloridionen ansteigt, kann dies zu einer pH-Wertabnahme führen und die Synthasen arbeiten nicht mehr im optimalen Bereich. Wie groß dieser Einfluß ist und ob man diesem durch Zugabe entsprechender Gegenionen entgegenwirken kann, wurde nicht untersucht.

Anhand der aus diesen Messreihen erhaltenen Sättigungskurven wurden für eine zweite Messreihe die Konditionen für jeden Aminosucker optimiert. Trotz des Fehlens der *N*-Acetylgruppe in den Aminosuckern werden diese von den beiden *N*-Acetylneuraminsäuresynthasen  $\text{NeuS}_{Nme}$  und  $\text{NeuS}_{Cje}$  ebenfalls als Substrate akzeptiert und die Reaktion verläuft in einer annehmbaren Zeit.



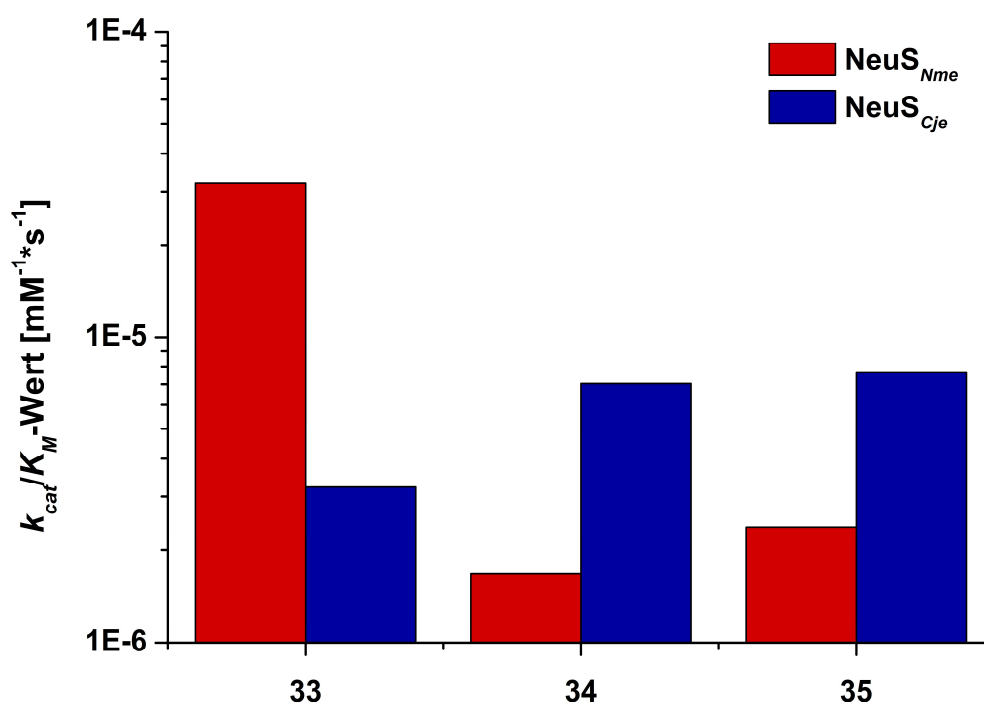
**Abbildung 3.28:**  $K_M$ -Werte der beiden *N*-Acetylneuraminsäuresynthasen NeuS<sub>Nme</sub> und NeuS<sub>Cje</sub> gegenüber den Aminosuckern Mannosamin **33**, Glucosamin **34** und Galactosamin **35**. Die Aminosucker wurden in Form ihrer neutralen Hydrochloride eingesetzt.

In Abbildung 3.28 sind die  $K_M$ -Werte der beiden Synthasen NeuS<sub>Nme</sub> und NeuS<sub>Cje</sub> für die jeweiligen Aminosucker dargestellt. NeuS<sub>Cje</sub> hat dabei eine um den Faktor zwei bessere Affinität zu den verschiedenen Aminosuckern als NeuS<sub>Nme</sub>. Für das dem natürlichen Substrat konfigurativer gleichende Mannosamin **33** liegt der  $K_M$ -Wert für NeuS<sub>Cje</sub> bei 52 mM und für NeuS<sub>Nme</sub> bei 101 mM. Innerhalb der Gruppe von Aminosuckern sinkt die Affinität beider Synthasen mit steigender konfigurativer Modifikation von der *manno*- über die *gluco*- zur *galacto*-Konfiguration. Der  $K_M$ -Werte für Mannosamin **33** von NeuS<sub>Nme</sub> mit 101 mM ist fast um einen Faktor zwei besser als für Galactosamin **35** mit 184 mM. Die Affinitäten für die Aminosucker Glucosamin **34** und Galactosamin **35** liegen im selben Größenordnungsbereich wie die  $K_M$ -Werte der zuvor vermessenen entsprechenden *N*-modifizierten Aminosuckerderivate. Drastischer ist der Unterschied bei Mannosamin **33**. Hier sinkt die Affinität der beiden Synthasen durch das Fehlen der im natürlichen Substrat *N*-Acetylmannosamin **2** vorhandenen *N*-Acetylgruppe um zwei bis zweieinhalb Größenordnungen ab.



**Abbildung 3.29:** Vergleich der molekularen Aktivität ( $k_{cat}$ -Wert) der beiden *N*-Acetylneuraminsäuresynthasen NeuS<sub>Nme</sub> und NeuS<sub>Cje</sub> untereinander zu den Aminozykern Mannosamin **33**, Glucosamin **34** und Galactosamin **35**. Für den besseren Vergleich ist die Darstellung hier logarithmisch gewählt.

Beide Synthasen zeigen identische katalytische Leistungsfähigkeit gegenüber den Aminozykern Glucosamin **34** und Galactosamin **35**. Diese liegen in der gleichen Größenordnung. Bei Mannosamin **33** als Substrat hingegen hat NeuS<sub>Nme</sub> mit einem  $k_{cat}$ -Wert von  $3,2 \cdot 10^{-3}/s$  eine um eine Größenordnung bessere katalytische Leistungsfähigkeit als NeuS<sub>Cje</sub> mit einem  $k_{cat}$ -Wert von  $1,7 \cdot 10^{-4}/s$ . Waren die  $K_M$ -Werte und somit die Affinität der beiden Synthasen von Glucosamin **34** und Galactosamin **35** zu den entsprechenden Aminozykenderivaten noch in der gleichen Größenordnung, wirkt sich das Fehlen der Amidfunktion vor allem in der *gluco*-Konfiguration stärker auf die katalytische Leistungsfähigkeit aus. Während der Einfluss durch die Substitution der *N*-Acetylgruppe gegen die freie Aminogruppe auf die  $k_{cat}$ -Werte für die beiden Synthasen noch gering ist, ist die katalytische Leistungsfähigkeit gegenüber Glucosamin **34** um drei Größenordnungen schlechter als bei den *N*-modifizierten Glucosaminderivaten. Dieselbe Tendenz zeichnet sich beim Vergleich der  $k_{cat}$ -Werte von Mannosamin **33** und den Mannosaminderivaten **3-9** ab.



**Abbildung 3.30:** Katalytischen Effizienz ( $k_{cat}/K_M$ ) der beiden *N*-Acetylneuraminsäuresynthasen NeuS<sub>Nme</sub> und NeuS<sub>Cje</sub> gegenüber den Aminosukzern Mannosamin **33**, Glucosamin **34** und Galactosamin **35**. Für den besseren Vergleich ist die Darstellung hier logarithmisch gewählt.

Die Tendenz, welche sich im Vergleich der katalytischen Leistungsfähigkeit der beiden Synthasen zu den Aminosukzern gezeigt hat, zeigt sich auch in ihrer katalytischen Effizienz gegenüber diesen Substraten (Abbildung 3.30). Beide Synthasen haben eine vergleichbare katalytische Effizienz gegenüber Glucosamin **34** und Galactosamin **35**, bei Mannosamin **33** unterscheiden sie sich jedoch um eine Größenordnung, d.h. der ( $k_{cat}/K_M$ )-Wert von NeuS<sub>Nme</sub> liegt bei  $3,2 \cdot 10^{-5} \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  für NeuS<sub>Cje</sub> bei  $3,22 \cdot 10^{-6} \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ . Die katalytische Effizienz gegenüber Galactosamin **35** und den entsprechenden *N*-modifizierten Galactosaminderivaten liegt in der gleichen Größenordnung, der ( $k_{cat}/K_M$ )-Wert von Glucosamin **34** mit  $1,65 \cdot 10^{-6} \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  ist um zwei bis drei Größenordnungen schlechter als die ( $k_{cat}/K_M$ )-Werte der Glucosaminderivate. Beim Vergleich der katalytischen Effizienz von NeuS<sub>Nme</sub> zu Mannosamin **33** [( $k_{cat}/K_M$ )-Wert  $3,2 \cdot 10^{-5} \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ] und der katalytischen Effizienz der Synthase zu ihrem natürlichen Substrat *N*-Acetylmannosamin **2** [( $k_{cat}/K_M$ )-Wert  $1,53 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ] hat NeuS<sub>Nme</sub> gegenüber Mannosamin **33** eine um fünf Größenordnungen geringere Effizienz. In Tabelle 3.22 sind alle kinetischen Daten der beiden Synthasen zu den Aminosukzern gegenübergestellt.

**Tabelle 3.22:** Affinität, Aktivität, katalytische Effizienz und massenspezifische Aktivität der beiden *N*-Acetylneuraminsäuresynthasen NeuS<sub>Nme</sub> und NeuS<sub>Cje</sub> gegenüber den Aminozykern Mannosamin **33**, Glucosamin **34** und Galactosamin **35** sowie dem natürlichen Substrat *N*-Acetylmannosamin **2**.

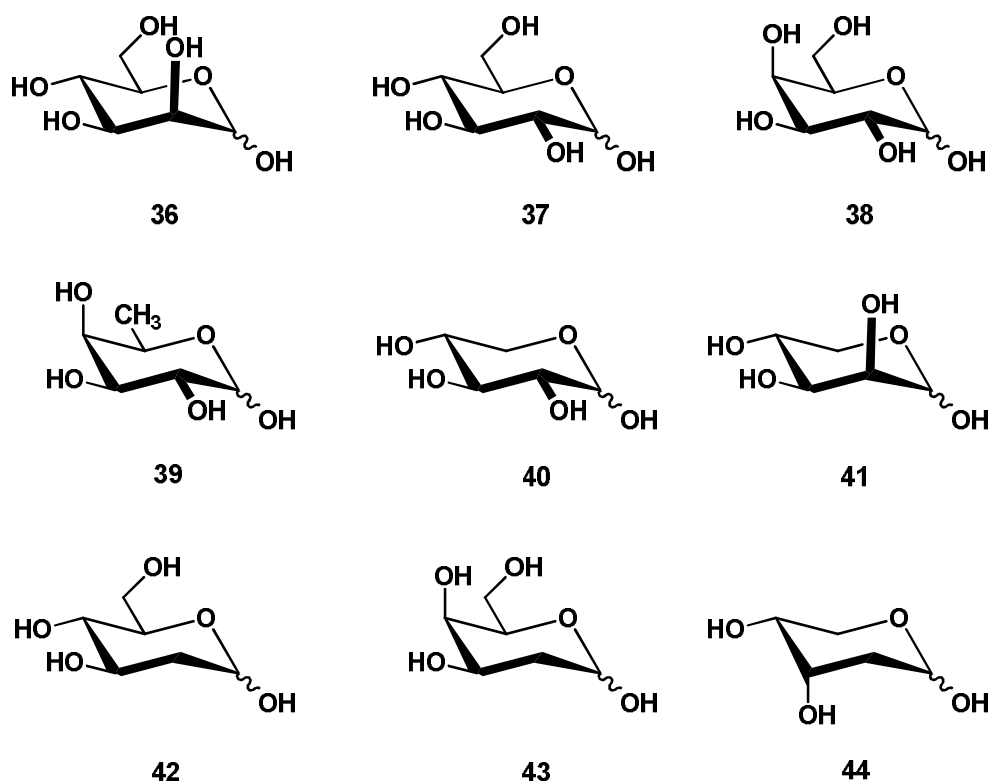
NeuS <sub>Nme</sub>				
	$K_M$ [mM]	$k_{cat}$ [s <sup>-1</sup> ]	$k_{cat}/K_M$ [mM <sup>-1</sup> *s <sup>-1</sup> ]	U/mg
<b>2</b>	0,49±0,02	7,5*10 <sup>-1</sup> ±1,0*10 <sup>-2</sup>	1,53	3,94
<b>33</b>	102±14,2	3,2*10 <sup>-3</sup> ±2,6*10 <sup>-4</sup>	3,2*10 <sup>-5</sup>	1,0*10 <sup>-1</sup>
<b>34</b>	122±22,0	2,0*10 <sup>-4</sup> ±2,2*10 <sup>-5</sup>	1,7*10 <sup>-6</sup>	1,2*10 <sup>-2</sup>
<b>35</b>	185±14,8	4,4*10 <sup>-4</sup> ±4,8*10 <sup>-5</sup>	2,4*10 <sup>-6</sup>	2,7*10 <sup>-2</sup>

NeuS <sub>Cje</sub>				
	$K_M$ [mM]	$k_{cat}$ [s <sup>-1</sup> ]	$k_{cat}/K_M$ [mM <sup>-1</sup> *s <sup>-1</sup> ]	U/mg
<b>2</b>	0,69±0,03	1,6*10 <sup>-1</sup> ±2,0*10 <sup>-2</sup>	2,3*10 <sup>-1</sup>	3,32
<b>33</b>	50±3,0	1,7*10 <sup>-4</sup> ±1,4*10 <sup>-5</sup>	3,2*10 <sup>-6</sup>	1,3*10 <sup>-2</sup>
<b>34</b>	61±4,3	4,3*10 <sup>-4</sup> ±1,7*10 <sup>-5</sup>	7,0*10 <sup>-6</sup>	3,3*10 <sup>-2</sup>
<b>35</b>	105±8,4	8,2*10 <sup>-4</sup> ±2,4*10 <sup>-5</sup>	7,7*10 <sup>-6</sup>	2,5*10 <sup>-2</sup>

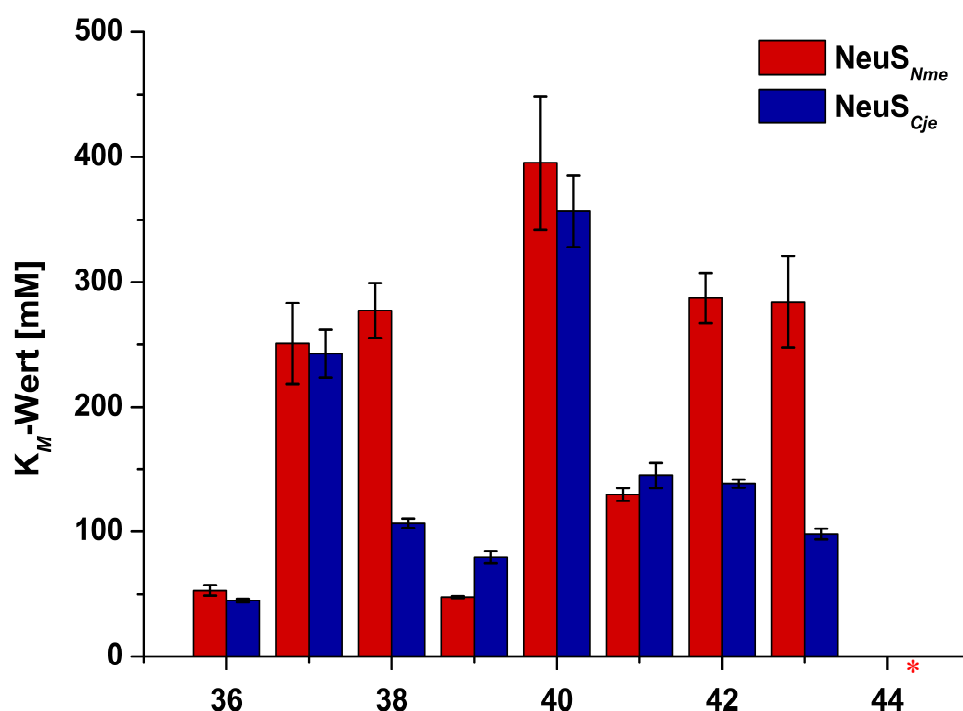
Die Anwesenheit der *N*-Acetylgruppe oder einer anderen *N*-modifizierten Seitenkette ist für die katalytische Aktivität der beiden *N*-Acetylneuraminsäuresynthasen NeuS<sub>Nme</sub> und NeuS<sub>Cje</sub> nicht essentiell, sie tolerieren offenbar auch die Anwesenheit einer freien Aminogruppe an der C2-Position. Diese Substitution ist allerdings schon in der *manno*-Konfiguration des natürlichen Substrates mit deutlich schlechteren kinetischen Daten verbunden. Diese werden noch schlechter, wenn man die Konfiguration an C2-Position oder an beiden C2/C4-Positionen ändert.

Mit den in Abbildung 3.31 gezeigten weiteren potenziellen Substraten sollten nun die anderen beiden Fragen von Seite 115 bezüglich der Flexibilität und Toleranz der Synthasen untersucht werden.



**Abbildung 3.31:** Weitere für die kinetischen Untersuchungen von NeuS<sub>Nme</sub> und NeuS<sub>Cje</sub> als potentielle Substrate getesteten Zucker **36-44**.

Untersucht werden sollte, welche Auswirkungen es auf die katalytische Aktivität der beiden Synthasen hat, wenn man die Aminokomponenten an C2-Position durch eine Hydroxygruppe ersetzt (Substrate **36** bis **38** in Abbildung 3.31). „Brauchen die Synthasen für ihre katalytische Aktivität eine funktionelle Gruppe an C-2 Position?“. Dies sollte durch die beiden Desoxyzuckern **42** und **43** untersucht werden. Mit D-Fucose **39** einem an C6-Position deoxygenierten *galacto*-konfigurierten Zucker und 2-Deoxy-D-Ribose **44** sollten, neben den bereits bekannten C2/C4-Modifikationen, noch weitreichendere Modifikationen im Zuckergrundgerüst untersucht werden. Bei 2-Deoxy-D- Ribose **44** handelt es sich um eine Pentose, die in wässrigen Lösungen überwiegend als 2-Deoxyribopyranose vorliegt. Hier ist neben der Deoxyfunktionalität an der C2-Position und dem Fehlen der CH<sub>2</sub>OH-Gruppe an Position 6 zusätzlich die Konfiguration an der C3-Position geändert. Desweiteren wurden noch die beiden Pentosen D-Lyxose **41** und D-Xylose **40** mit den beiden Synthasen vermessen. In wässriger Lösung liegt das Gleichgewicht bei beiden Pentosen zum größten Teil auf der Seite der Pyranoseform. D-Lyxose **41** liegt dabei als *manno*-konfigurierter, um ein C-Atom an Position 6 verkürzter Zucker vor. D-Xylose **40** ist entsprechend *gluco*-konfiguriert. Die Messungen in 96-Lochplatten erfolgten entsprechend denen mit den Aminoazuckern.

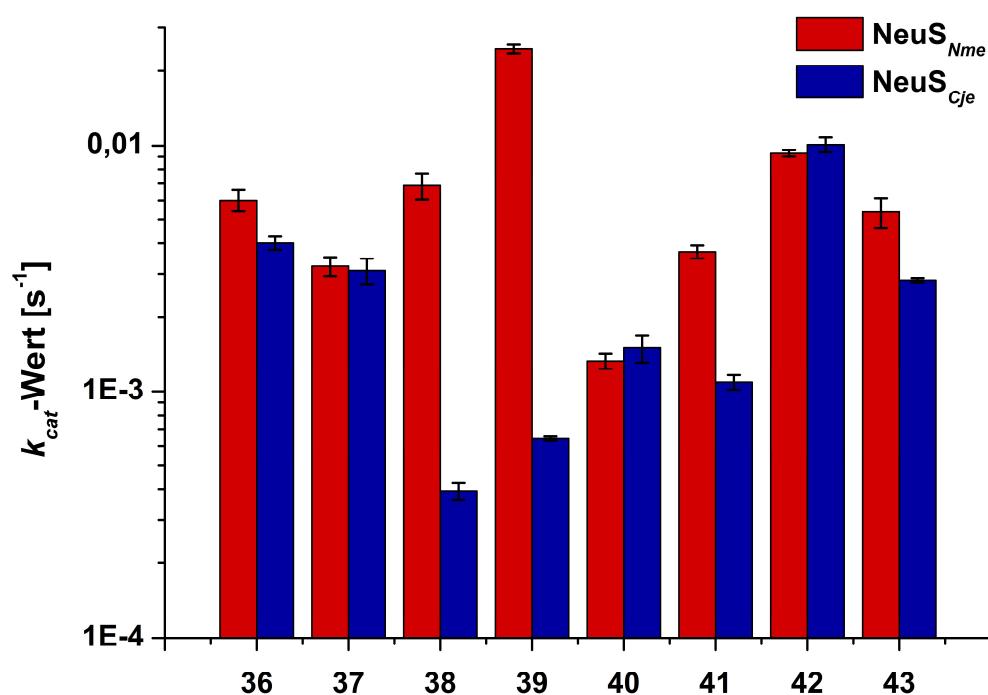


**Abbildung 3.32:**  $K_M$ -Werte der beiden *N*-Acetylneuraminsäuresynthasen NeuS<sub>Nme</sub> und NeuS<sub>Cje</sub> gegenüber den unterschiedlichen Zuckern **36** bis **44**. \* Für Substrat **44** konnten trotz mehrerer Versuche keine auswertbaren Kurven gemessen werden.

Für alle vermessenen Zucker, ausschließlich der 2-Desoxyribose **44**, konnten über mehrmalige Messungen gute Sättigungskurven erhalten werden. Das Ergebnis mit 2-Desoxyribose **44**, bei der keinerlei Sättigungskurve gemessen werden konnte, bestätigt die Ergebnisse von *Knorst*.<sup>[69]</sup> Sowohl die Neuraminsäurealdolase NeuA<sub>Nme</sub>, als auch die *N*-Acetylneuraminsäuresynthasen NeuS<sub>Nme</sub> und NeuS<sub>Cje</sub> akzeptieren keine konfigurate Änderung an der C3-Position. Durch diese Konfigurationsänderung kommt es bei beiden Enzymklassen zum totalen Aktivitätsverlust. Die equatoriale Stellung der Hydroxygruppe an der C-3 Position ist essentiell notwendig für den Ringschluss zur entsprechenden Neuraminsäure, was mit einer Hydroxygruppe in axialer Stellung nicht mehr möglich ist ohne Inversion des Pyranoserings.

Beim Vergleich der  $K_M$ -Werte erkennt man, dass beide Synthasen in dieser Gruppe von Zuckern die beste Affinität zu D-Mannose **36** und zu D-Fucose **39** besitzen. Die  $K_M$ -Werte für D-Mannose **36** sind mit 53 mM für NeuS<sub>Nme</sub> und 45 mM für NeuS<sub>Cje</sub> fast identisch. Für D-Fucose **39** hat NeuS<sub>Nme</sub> mit einem  $K_M$ -Wert von 47 mM eine um den Faktor zwei bessere Affinität als NeuS<sub>Cje</sub>. In der Gruppe D-Mannose **36**, D-Glucose **37** und D-Galactose **38** sinken

die  $K_M$ -Werte für die Substrate mit wechselnder konfigurativer Modifikation weiter ab, gegenüber D-Mannose **36** sind sie um einen Faktor fünf schlechter. Bei NeuS<sub>Cje</sub> allerdings ist die Affinität zu D-Galactose **39** mit einem  $K_M$ -Wert von 106 mM um über einen Faktor zwei besser, sowohl gegenüber D-Glucose **37**, als auch gegenüber der Affinität von NeuS<sub>Nme</sub> zu D-Galactose **39**, wo der  $K_M$ -Wert sogar bei 277 mM liegt. Einen großen Unterschied in den Affinitäten sieht man bei der NeuS<sub>Nme</sub> und NeuS<sub>Cje</sub> gegenüber den beiden Pentosen D-Lyxose **41** und D-Xylose **40**. Der  $K_M$ -Wert für die *manno*-konfigurierte D-Lyxose **41** liegt bei beiden Synthasen um 130-140 mM, dem gegenüber ist der  $K_M$ -Wert für die *gluco*-konfigurierte D-Xylose **40** um einen Faktor drei schlechter. Mit Ausnahme von D-Mannose **36** und D-Fucose **39** liegen die  $K_M$ -Werte für die restlichen Zucker dieser Gruppe im Schnitt um einen Faktor eins bis drei schlechter als für die entsprechenden *N*-modifizierten Aminosuckerderivaten. Die Unterschiede zu den  $K_M$ -Werten der Aminosucker sind geringer. NeuS<sub>Nme</sub> hat zu D-Mannose **36** mit einem  $K_M$ -Wert von 53 mM eine doppelt so hohe Affinität als zu D-Mannosamin **33** mit einem  $K_M$ -Wert von 101 mM. Die NeuS<sub>Cje</sub> hat dagegen nahezu identische Affinitäten zu beiden Substraten.



**Abbildung 3.33:** Vergleich der molekularen Aktivität ( $k_{cat}$ -Wert) der beiden *N*-Acetylneuraminsäuresynthasen NeuS<sub>Nme</sub> und NeuS<sub>Cje</sub> mit den Zuckern **36-43**. Für den besseren Vergleich ist die Darstellung hier logarithmisch gewählt.

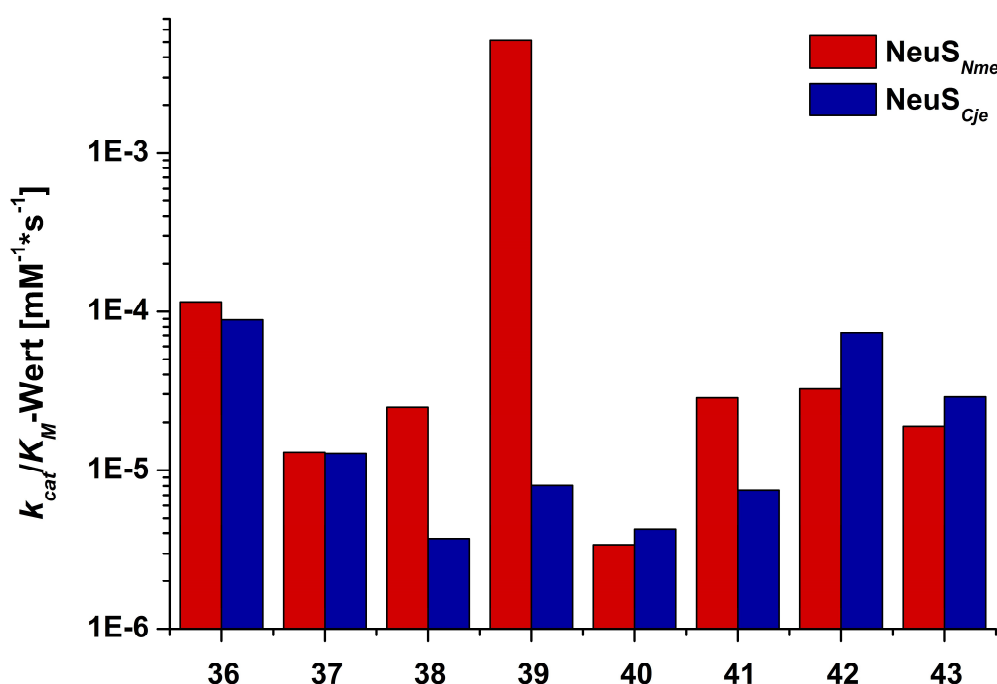


---

Der Trend, der sich in allen bisherigen ermittelten kinetischen Daten zeigt, setzt sich auch bei diesen Zuckern fort. Die  $k_{cat}$ -Werte für die jeweiligen Substrate unterscheiden sich bei den beiden Synthasen NeuS<sub>Nme</sub> und NeuS<sub>Cje</sub> mit zwei Ausnahmen kaum und liegen in derselben Größenordnung (Abbildung 3.33). Für D-Fucose **39** besitzt die NeuS<sub>Nme</sub> einen  $k_{cat}$ -Wert von  $2,45 \cdot 10^{-2}/s$  und damit eine um zwei Größenordnungen bessere katalytische Leistungsfähigkeit als die NeuS<sub>Cje</sub> mit einem  $k_{cat}$ -Wert von  $6,4 \cdot 10^{-4}/s$ . Die zweite Ausnahme ist D-Galactose **38**. Zwar hat die NeuS<sub>Cje</sub> eine höhere Affinität zu diesem Substrat als die NeuS<sub>Nme</sub>, jedoch besitzt die NeuS<sub>Nme</sub> mit einem  $k_{cat}$ -Wert von  $6,9 \cdot 10^{-3}/s$  eine Leistungsfähigkeit, die um eine Größenordnung besser ist als die der NeuS<sub>Cje</sub> mit einem  $k_{cat}$ -Wert von  $3,9 \cdot 10^{-4}/s$ .

Beim Vergleich mit den  $k_{cat}$ -Werten der beiden Synthasen zu den Aminosukzern zeigt sich, dass die  $k_{cat}$ -Werte für die in Abbildung 3.31 aufgelisteten Zucker um eine Größenordnung besser sind und die Synthasen somit für diese Zucker eine bessere katalytische Leistungsfähigkeit besitzen. Diese liegt allerdings gegenüber den entsprechenden *N*-modifizierten Aminosukzenderivaten drei bzw. vier Größenordnungen niedriger.

Die NeuS<sub>Nme</sub> zeigt gegenüber D-Fucose **39** als Substrat eine ähnliche katalytische Leistungsfähigkeit, wie sie die Synthase auch gegenüber den *N*-modifizierten Aminosukzenderivaten besitzt.



**Abbildung 3.34:** Vergleich der katalytischen Effizienz ( $k_{cat}/K_M$ ) der beiden *N*-Acetylneuraminsäuresynthasen NeuS<sub>Nme</sub> und NeuS<sub>Cje</sub> gegenüber den jeweiligen Zuckern **36-43**. Für den besseren Vergleich ist die Darstellung logarithmisch gewählt.

Die katalytische Effizienz der beiden Synthasen gegenüber den Zuckern D-Mannose **36**, D-Glucose **37** und D-Galactose **38** (Abbildung 3.34) liegt mit  $k_{cat}/K_M$ -Werten zwischen  $10^{-4}$ - $10^{-6}/\text{mM}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$  in der gleichen Größenordnung wie die entsprechenden Aminosucker. Den größten Unterschied in der katalytischen Effizienz besitzen die beiden Synthasen gegenüber D-Galactose **38**. NeuS<sub>Nme</sub> hat einen  $k_{cat}/K_M$ -Wert von  $2,5 \cdot 10^{-5}/\text{mM}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$  und besitzt eine um eine Größenordnung bessere Effizienz zu diesem Substrat als NeuS<sub>Cje</sub> mit einem  $k_{cat}/K_M$ -Wert von  $3,7 \cdot 10^{-6}/\text{mM}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ . Für die Pentosen D-Xylose **40**, D-Lyxose **41** sowie die beiden Deoxyzucker 2-Deoxy-D-glucose **42** und 2-Deoxy-D-galactose **43** als Substrate haben NeuS<sub>Nme</sub> und NeuS<sub>Cje</sub> eine ähnliche katalytische Effizienz. Der Unterschied in der katalytischen Effizienz gegenüber D-Fucose **39** als Substrat beträgt zwischen NeuS<sub>Nme</sub> ( $k_{cat}/K_M$ -Wert  $5,1 \cdot 10^{-3}/\text{mM}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ ) und NeuS<sub>Cje</sub> ( $k_{cat}/K_M$ -Wert  $8,1 \cdot 10^{-6}/\text{mM}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ ) drei Größenordnungen. In Tabelle 3.23 sind alle kinetischen Daten der beiden Synthasen zu den Zuckern **36-43** zusammengefasst.

**Tabelle 3.23:** Affinität, Aktivität, katalytische Effizienz und massenspezifische Aktivität der beiden *N*-Acetylneuraminsäuresynthasen NeuS<sub>Nme</sub> und NeuS<sub>Cje</sub> gegenüber den Zuckern **36–43** sowie dem natürlichen Substrat *N*-Acetylmannosamin **2** im Überblick. 2-Deoxy-D-Ribose **44** wird nicht als Substrat akzeptiert.

NeuS <sub>Nme</sub>				
	$K_M$ [mM]	$k_{cat}$ [s <sup>-1</sup> ]	$k_{cat}/K_M$ [mM <sup>-1</sup> *s <sup>-1</sup> ]	U/mg
<b>2</b>	0,49±0,02	7,5*10 <sup>-1</sup> ±1,0*10 <sup>-2</sup>	1,53	3,94
<b>36</b>	53±4,3	6,0*10 <sup>-3</sup> ±6,0*10 <sup>-4</sup>	1,2*10 <sup>-4</sup>	1,9*10 <sup>-1</sup>
<b>37</b>	251±32,6	3,2*10 <sup>-3</sup> ±2,9*10 <sup>-4</sup>	1,3*10 <sup>-5</sup>	1,0*10 <sup>-1</sup>
<b>38</b>	277±22,2	6,9*10 <sup>-3</sup> ±8,2*10 <sup>-4</sup>	2,5*10 <sup>-5</sup>	4,3*10 <sup>-1</sup>
<b>39</b>	48±0,7	2,5*10 <sup>-2</sup> ±9,8*10 <sup>-4</sup>	5,1*10 <sup>-3</sup>	1,9*10 <sup>-1</sup>
<b>40</b>	395±53,4	1,3*10 <sup>-3</sup> ±9,3*10 <sup>-5</sup>	3,4*10 <sup>-6</sup>	8,3*10 <sup>-2</sup>
<b>41</b>	130±5,2	3,7*10 <sup>-3</sup> ±2,2*10 <sup>-4</sup>	2,9*10 <sup>-5</sup>	1,2*10 <sup>-1</sup>
<b>42</b>	287±20,1	9,3*10 <sup>-3</sup> ±2,8*10 <sup>-4</sup>	3,2*10 <sup>-5</sup>	5,8*10 <sup>-1</sup>
<b>43</b>	284±36,9	5,4*10 <sup>-3</sup> ±7,5*10 <sup>-4</sup>	1,9*10 <sup>-5</sup>	3,3*10 <sup>-1</sup>

NeuS <sub>Cje</sub>				
	$K_M$ [mM]	$k_{cat}$ [s <sup>-1</sup> ]	$k_{cat}/K_M$ [mM <sup>-1</sup> *s <sup>-1</sup> ]	U/mg
<b>2</b>	0,69±0,03	1,6*10 <sup>-1</sup> ±2,0*10 <sup>-2</sup>	2,30*10 <sup>-1</sup>	3,32
<b>36</b>	45±1,4	4,0*10 <sup>-3</sup> ±2,4*10 <sup>-4</sup>	8,9*10 <sup>-5</sup>	3,1*10 <sup>-2</sup>
<b>37</b>	242±19,4	3,1*10 <sup>-3</sup> ±3,7*10 <sup>-4</sup>	1,3*10 <sup>-5</sup>	2,4*10 <sup>-2</sup>
<b>38</b>	106±3,3	3,9*10 <sup>-4</sup> ±3,1*10 <sup>-5</sup>	3,7*10 <sup>-6</sup>	1,2*10 <sup>-2</sup>
<b>39</b>	80±4,8	6,4*10 <sup>-4</sup> ±1,3*10 <sup>-5</sup>	8,0*10 <sup>-6</sup>	2,0*10 <sup>-2</sup>
<b>40</b>	357±28,5	1,5*10 <sup>-3</sup> ±1,9*10 <sup>-4</sup>	4,2*10 <sup>-6</sup>	4,6*10 <sup>-2</sup>
<b>41</b>	145±10,2	1,1*10 <sup>-3</sup> ±7,6*10 <sup>-5</sup>	7,5*10 <sup>-6</sup>	3,4*10 <sup>-2</sup>
<b>42</b>	138±3,3	1,0*10 <sup>-2</sup> ±7,1*10 <sup>-4</sup>	7,3*10 <sup>-5</sup>	7,8*10 <sup>-2</sup>
<b>43</b>	98±4,2	2,8*10 <sup>-3</sup> ±5,7*10 <sup>-5</sup>	2,9*10 <sup>-5</sup>	2,2*10 <sup>-2</sup>

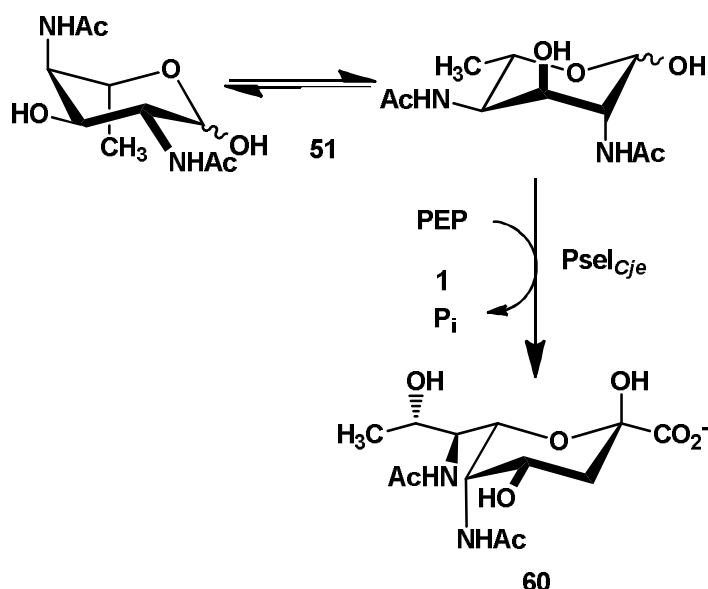
Das Substratspektrum der beiden Synthasen konnte mittels der kinetischen Untersuchungen nochmals erweitert werden. Eine Substitution der nicht natürlichen Aminogruppe an der C2-Position gegen eine Hydroxygruppe wird von beiden Synthasen akzeptiert, wenn auch mit entsprechend schlechterer Kinetik. Aus den kinetischen Untersuchungen der 2-Deoxy-Zucker ergibt sich, dass eine funktionelle Gruppe an der C2-Position, weder eine Amidgruppe noch

---

eine andere polare Funktionalität, für die katalytische Aktivität der NeuS<sub>Nme</sub> bzw. NeuS<sub>Cje</sub> essentiell ist. Knorst<sup>[69]</sup> hatte in ihrer Arbeit unter anderem semipräparative Untersuchungen der Neuraminsäurealdolase NeuA<sub>Nme</sub> mit 2-Deoxy-D-ribose **44** und L-konfigurierten Zuckern als Substraten durchgeführt, konnte jedoch dünnsschichtchromatographisch keinen Umsatz detektieren. Da wir mit diesem gekoppelten kontinuierlichen Enzym-Assay ein viel sensitiveres Detektionssystem gegenüber der Dünnschichtchromatographie in der Hand haben, hatte Vethaseelan im Rahmen ihrer Bachelorarbeit<sup>[118]</sup> die Synthasen auf ihre Toleranz gegenüber einen Wechsel der Konfiguration an der C3-Position hin untersucht, dazu wurden 2-Deoxy-D-ribose **44** und L-Lyxose **45** mit dem Assay vermessen. Vethaseelan<sup>[118]</sup> konnte in diesen Messungen aber nur eine komplette Inaktivität der Synthasen feststellen. Auch wenn die beiden Synthasen ein großes Substratspektrum akzeptieren, darf offensichtlich auch hier die Konfiguration an der C3-Position nicht geändert werden, diese ist essentiell für die Aktivität. Eine Verkürzung des Zuckergrundgerüsts um ein Kohlenstoffatom, wie bei den Pentosen D-Xylose **40** und D-Lyxose **41** wird von beiden Synthasen noch toleriert. Ganz unterschiedlich verhalten sich die Synthasen jedoch gegenüber der 6-Deoxyhexose D-Fucose **39**. Für die NeuS<sub>Cje</sub> ist D-Fucose **39** ein Substrat, welches der allgemeinen Tendenz entsprechend schlechter ist, als die vermessenen *N*-acylierten Mannosamin- und Glucosaminderivate. Dagegen ist D-Fucose **39** für die NeuS<sub>Nme</sub> ein Substrat, welches bezüglich der Affinität und Aktivität in den gleichen Größenordnungen liegt wie die entsprechenden *N*-acylierten Glucosaminderivate.

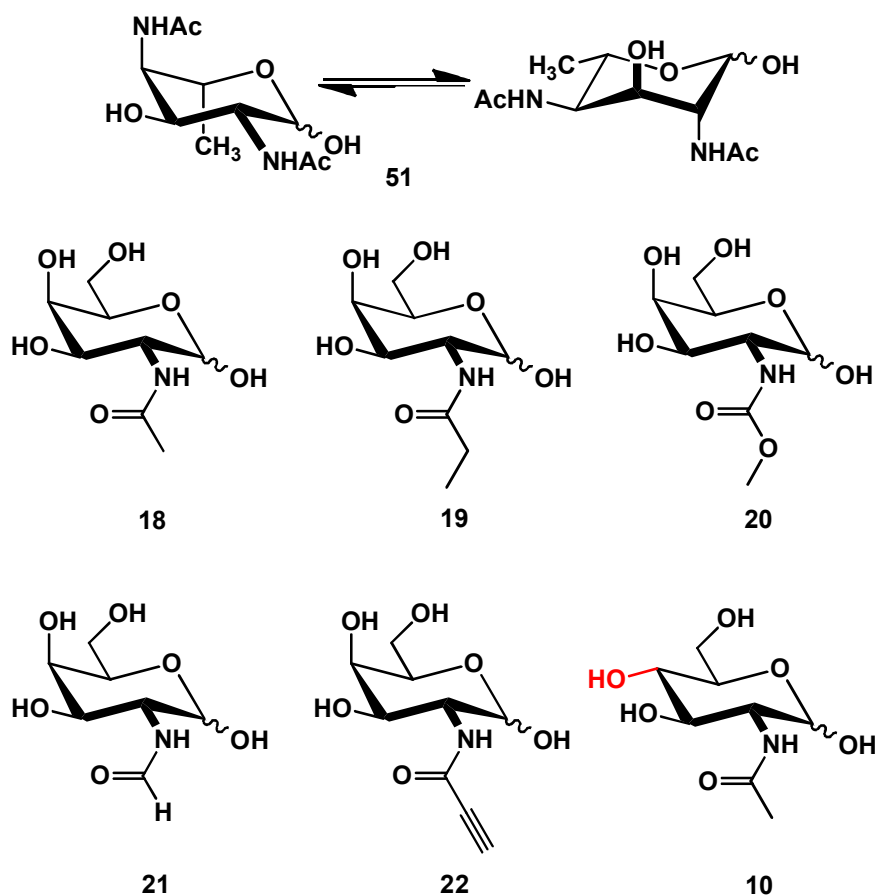
### 3.4.9 Kinetische Untersuchung der Pseudaminsäuresynthese aus *Campylobacter jejuni* (PseS<sub>Cje</sub>)

In *Campylobacter jejuni* wurden neben dem Gen, welches für die *N*-Acetylneuraminsäuresynthase NeuS<sub>Cje</sub> codiert, noch zwei weitere Gene identifiziert, die ebenfalls für PEP-abhängige Synthasen codieren.<sup>[73]</sup> Für die Synthase, die in der Literatur unter dem Namen NeuB2 geführt ist, ist die genaue Funktion in der Modifikation des Flagellum bisher noch unbekannt.<sup>[73]</sup> Das dritte Gen in diesem Gencluster codiert für die Pseudaminsäuresynthase (PseS<sub>Cje</sub>).<sup>[80]</sup> Die Synthase PseS<sub>Cje</sub> katalysiert die Kondensationsreaktion von 2,4Diacetamido-2,4,6-trideoxy-L-Altrose **51** und Phosphoenolpyruvat **1** zur Bildung von Pseudaminsäure **60** (Schema 3.30).



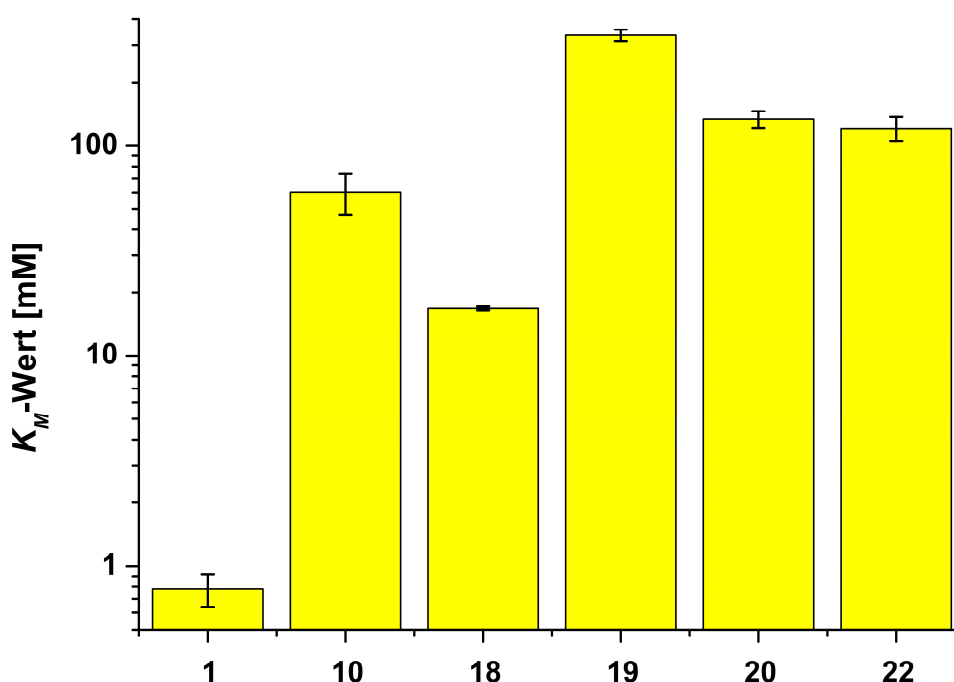
**Schema 3.30:** In *Campylobacter jejuni* von der PEP-abhängigen Pseudaminsäuresynthase PseS<sub>Cje</sub> katalysierte Kondensationsreaktion zwischen 6-Deoxy-AltDiNac **51** und PEP **1** zur Pseudaminsäure **60**.

Da der Aufwand zur Synthese des natürlichen Substrats zu aufwendig und zeitintensiv ist<sup>[106, 134]</sup>, wurden als Substrate für die kinetischen Untersuchungen *N*-Acetylglucosamin **10** und *N*-Acetylgalactosamin **18** und dessen Derivate verwendet (Abbildung 3.35). *N*-Acetylgalactosamin **18** ist dem natürlichen Substrat **51** der PseS<sub>Cje</sub> von der Konfiguration her gleich, besitzt jedoch an der C4-Position keine zweite Acetamidogruppe und die C6-Position ist nicht deoxygeniert.



**Abbildung 3.35:** Im kontinuierlich gekoppelten Assay mit der Pseudaminsäuresynthase  $\text{PseS}_{Cje}$  getesteten Substrate. Neben *N*-Acetylglucosamin **10** waren dies die *N*-acylierten Glucosaminderivate **11-15** und die entsprechenden Galactosaminderivate **18-22**.

Die kinetischen Untersuchungen wurden alle im 96-Lochplatten-Format durchgeführt wobei die eingesetzte Enzymmenge an  $\text{PseS}_{Cje}$  bei 200  $\mu\text{g}/\text{Well}$  lag und die Substratkonzentration zwischen 0-500 mM variiert wurde. Für die Vermessung von Phosphoenolpyruvat **1** wurde anstelle des natürlichen Substrates 6-Deoxy-AltdiNAc **51** wurde nicht *N*-Acetylgalactosamin **18** eingesetzt sondern *N*-Acetylglucosamin **10**. Zu diesem Zeitpunkt standen keine ausreichenden Mengen an *N*-Acetylgalactosamin **18** zur Verfügung. Die Endkonzentration von *N*-Acetylglucosamin **10** betrug 50 mM. Die Messzeiten im Assay betrugen 3-5 Stunden.



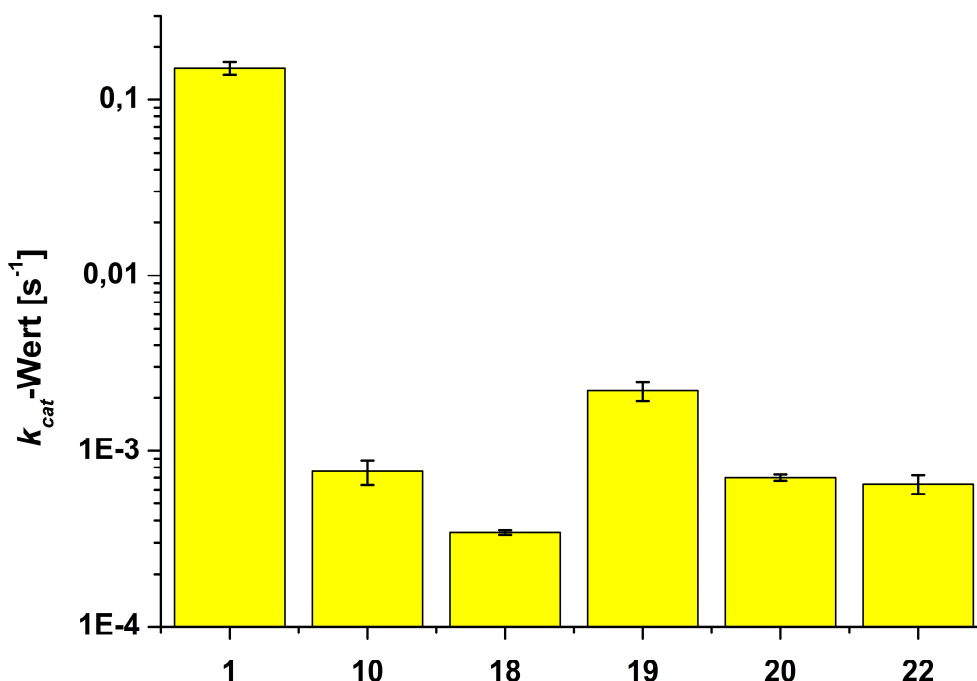
**Abbildung 3.36:**  $K_M$ -Werte der Pseudaminsäuresynthase  $\text{PseS}_{Cje}$  gegenüber dem natürlichen Substrat PEP **1** und den *N*-modifizierten Aminozyuckeranaloga **10** und **18-22**. Zum besseren Vergleich ist die Auftragung logarithmisch.

Die Vermessung der verschiedenen Substrate zeigte, dass bei den Glucosaminderivaten **10-15** nur für das *N*-Acetylglucosamin **10** auswertbare Messkurven erhalten werden konnten. Bei allen anderen Glucosaminderivaten **11-15** war in den durchgeführten Messungen im eingesetzten Konzentrationsbereich keine Abnahme der Absorption zu detektieren. Für die verwendeten Galactosaminderivate **18-22** konnten auswertbare Messkurven erhalten werden. Der mit diesem kontinuierlichen Assay gemessene und aus der Sättigungskurve bestimmte  $K_M$ -Wert von  $\text{PseS}_{Cje}$  für Phosphoenolpyruvat **1** liegt bei 0,78 mM. Dieser Wert für die Affinität der Pseudaminsäuresynthase gegenüber Phosphoenolpyruvat **1** ist um eine Größenordnung schlechter, als der in der Literatur beschriebene  $K_M$ -Wert für Phosphoenolpyruvat **1** von 6,5  $\mu\text{M}$ .<sup>[80]</sup> Die Gruppe um *Chou* hatte ihre kinetischen Studien mit der  $\text{PseS}_{Cje}$  in einem gekoppelten Phosphat-Assay vermessen, zur Bestimmung des  $K_M$ -Wertes für PEP erfolgten ihren Messungen allerdings in Gegenwart des natürlichen Substrates der Synthase 6-Deoxy-AltdiNAc **5**<sup>[80]</sup> und nicht wie im Rahmen dieser Arbeit gegen das weit schlechtere Analogon *N*-Acetylglucosamin **10**. Die beste Affinität besitzt die  $\text{PseS}_{Cje}$  (Abbildung 3.36) in dieser Substratpalette gegenüber *N*-Acetylgalactosamin **18**

---

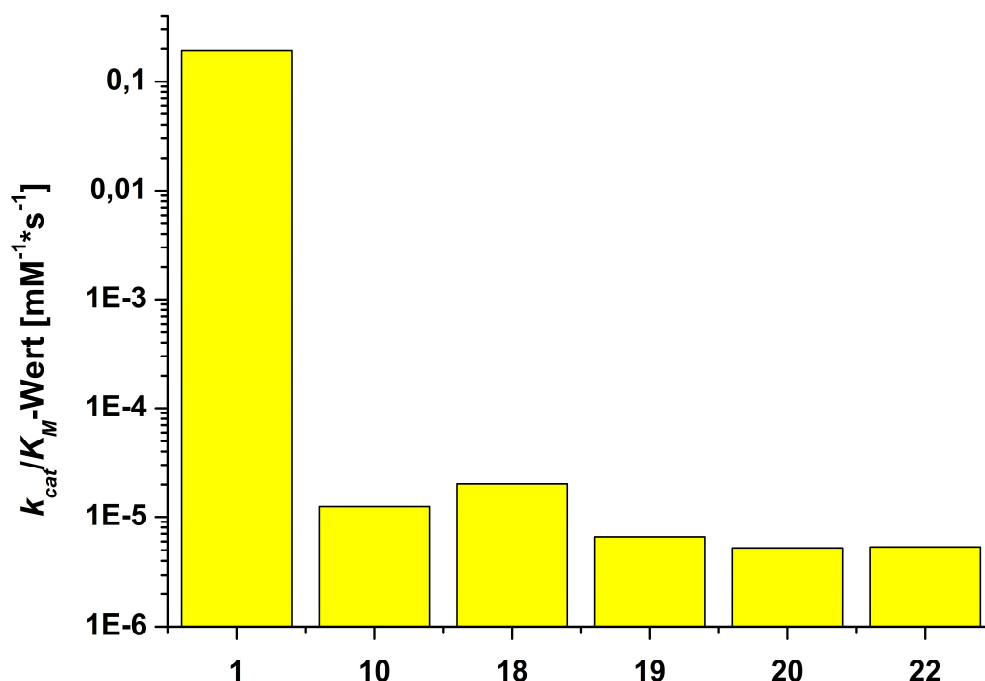
( $K_M$ -Wert: 16,7 mM), da dieses Substrat dem natürlichen Substrat konfiguratив und strukturell am ähnlichsten ist. Durch das Fehlen der zweiten *N*-Acetylgruppe an der C4-Position, Konfigurationsinversion an C5 und der zusätzlich an der C6-Position vorhandenen Hydroxyfunktionalität sinkt die Affinität der Pseudaminsäuresynthase im Vergleich zum natürlichen Substrat 6-Deoxy-AltdiNAc **51** um über zwei Größenordnungen ab. Der  $K_M$ -Wert für das natürliche Substrat 6-Deoxy-AltdiNAc **51** wurde von Chou im gekoppelten Phosphat-Assay zu 9,5  $\mu$ M bestimmt.<sup>[80]</sup> Durch Substitution der *N*-Acetylgruppe gegen strukturell und elektronisch andere *N*-Acylgruppen der *galacto*-Konfiguration sinkt die Affinität der Synthase nochmals stark ab. Dabei wird die Verlängerung der Seitenkette um eine Methoxygruppe ( $K_M$ -Wert für **20** 133 mM) oder einer Methingruppe ( $K_M$ -Wert für **22** 120 mM), besser von der Synthase akzeptiert, als eine Verlängerung der Seitenketten durch eine Methylgruppe ( $K_M$ -Wert für **19** 335 mM). Ändert sich die Konfiguration im Substrat von *galacto*- in *gluco*-Konfiguration wird die Affinität um den Faktor drei schlechter ( $K_M$ -Wert für **10** 60 mM, im Vergleich zu 17 mM für **18**). Eine Verkürzung der Seitenkette vom *N*-Acetyl- zum *N*-Formylgalactosamin **21** wurde in den Messungen von der *PseS<sub>Cje</sub>* als Substrat nicht mehr hinreichend erkannt. Neben den *N*-modifizierten Glucosamin- und Galactosaminderivaten wurden zusätzlich noch Galactosamin **35** und D-Galactose **38** vermessen, jedoch konnte bei diesen Substraten ebenfalls keine Abnahme der Absorption gemessen werden. Im Vergleich der  $K_M$ -Werte für die gemessenen Substrate zwischen allen untersuchten PEP-abhängigen Synthasen, hat die Pseudaminsäuresynthase *PseS<sub>Cje</sub>* eine bessere Affinität zu *N*-Acetylglucosamin **10** und *N*-Acetylgalactosamin **18** als die beiden *N*-Acetylneuraminsäuresynthasen *NeuS<sub>Nme</sub>* und *NeuS<sub>Cje</sub>*. Der Unterschied in den  $K_M$ -Werten beträgt einen Faktor zweieinhalb bis drei. Sehr deutlich ist auch der Unterschied in der Affinität zum *N*-Methoxycarbonylgalactosamin **20**, das von den beiden *N*-Acetylneuraminsäuresynthasen *NeuS<sub>Nme</sub>* und *NeuS<sub>Cje</sub>* um einen Faktor zwei bis drei besser als Substrat akzeptiert wird.





**Abbildung 3.37:** Molekulare Aktivität ( $k_{cat}$ -Wert) der Pseudaminsäuresynthase PseS<sub>Cje</sub> gegenüber dem natürlichen Substrat PEP **1** und den *N*-acylierten Aminosukzuckerderivaten **10** und **18-22**. Zum besseren Vergleich ist die Auftragung logarithmisch.

Die katalytische Leistungsfähigkeit der Pseudaminsäuresynthase PseS<sub>Cje</sub> (Abbildung 3.37) mit den Galactosaminderivaten **18-22** liegt annähernd in derselben Größenordnung. Positiv wirkt sich hierbei die Substitution der *N*-Acetylgruppe ( $k_{cat}$ -Wert von **18**  $3,4 \cdot 10^{-4}$ /s) gegen die *N*-Methoxygruppe ( $k_{cat}$ -Wert von **20**  $2,2 \cdot 10^{-3}$ /s) auf die Wechselzahl der PseS<sub>Cje</sub> aus. Auch gegenüber dem *N*-Acetylglucosamin **10** als Substrat zeigt die PseS<sub>Cje</sub> eine leicht bessere katalytische Leistungsfähigkeit als zu *N*-Acetylgalactosamin **18**. Die Wechselzahl für *N*-Propinoylgalactosamin **22** ist bei den beiden *N*-Acetylneuraminsäuresynthasen NeuS<sub>Nme</sub> ( $k_{cat}$ -Wert von  $1,3 \cdot 10^{-2}$ /s) und NeuS<sub>Cje</sub> ( $k_{cat}$ -Wert von  $5,6 \cdot 10^{-3}$ /s) um eine bis zwei Größenordnung besser als die der PseS<sub>Cje</sub> für dieses Substrat ( $k_{cat}$ -Wert für **22** von  $6,5 \cdot 10^{-4}$ /s).



**Abbildung 3.38:** Katalytischen Effizienz ( $k_{cat}/K_M$ ) der Pseudaminsäuresynthase PseS<sub>Cje</sub> gegenüber dem natürlichen Substrat PEP **1** und den *N*-modifizierten Aminosuckerderivaten **10** und **18-22**. Zum besseren Vergleich ist die Auftragung logarithmisch.

Die aus den ermittelten  $K_M$ - und  $k_{cat}$ -Werten berechnete katalytische Effizienz der Pseudaminsäuresynthase PseS<sub>Cje</sub> zu den verschiedenen *N*-modifizierten Derivaten (Abbildung 3.38) zeigt, dass das dem natürlichen Substrat konfiguratив am ähnlichste *N*-Acetylgalactosamin **18** in dieser Gruppe das beste Substrat mit einem  $k_{cat}/K_M$ -Wert von  $2,0 \cdot 10^{-5}/\text{mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  ist, gefolgt von *N*-Acetylglucosamin **10** mit einem  $k_{cat}/K_M$ -Wert von  $1,3 \cdot 10^{-5}/\text{mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ . Substitution der Seitenkette durch Kettenverlängerung oder Einführen eines weiteren Heteroatoms, wie es bei *N*-Methoxycarbonylgalactosmin **20** der Fall ist, senkt die katalytische Effizienz von PseS<sub>Cje</sub> um eine Größenordnung ab. Tabelle 3.24 fasst die Ergebnisse zusammen.

**Tabelle 3.24:** Affinität, Aktivität, katalytische Effizienz und massenspezifische Aktivität der Pseudaminsäuresynthase  $\text{PseS}_{Cje}$  gegenüber dem natürlichen Substrat PEP **1** und den *N*-acylierten Aminosukkerderivaten **10** und **18-22** im Überblick.

	$\text{PseS}_{Cje}$			
	$K_M$ [mM]	$k_{cat}$ [s <sup>-1</sup> ]	$k_{cat}/K_M$ [mM <sup>-1</sup> *s <sup>-1</sup> ]	U/mg
<b>1</b>	0,78±0,14	1,5*10 <sup>-1</sup> ±1,2*10 <sup>-2</sup>	1,9*10 <sup>-1</sup>	9,9*10 <sup>-1</sup>
<b>10</b>	60±13,3	7,6*10 <sup>-4</sup> ±1,2*10 <sup>-4</sup>	1,3*10 <sup>-5</sup>	3,0*10 <sup>-3</sup>
<b>18</b>	17±0,4	3,4*10 <sup>-4</sup> ±1,0*10 <sup>-5</sup>	2,0*10 <sup>-5</sup>	2,3*10 <sup>-3</sup>
<b>19</b>	335±21,8	2,2*10 <sup>-3</sup> ±2,8*10 <sup>-4</sup>	6,6*10 <sup>-6</sup>	1,5*10 <sup>-2</sup>
<b>20</b>	133±11,9	7,0*10 <sup>-4</sup> ±2,8*10 <sup>-5</sup>	5,3*10 <sup>-6</sup>	4,6*10 <sup>-3</sup>
<b>22</b>	120±15,7	6,5*10 <sup>-4</sup> ±7,7*10 <sup>-5</sup>	5,4*10 <sup>-6</sup>	4,3*10 <sup>-3</sup>

Auch die Pseudaminsäuresynthase  $\text{PseS}_{Cje}$  lässt sich in dem gekoppelten kontinuierlichen Assay im 96-Lochplatten-Format kinetisch gut vermessen. Da die Bestimmung der kinetischen Daten von PEP **1** nicht in Anwesenheit des zweiten natürlichen Substrates **51** der Synthase erfolgte, ist hier der  $K_M$ -Wert für PEP **1** im Vergleich zu dem literaturbekannten  $K_M$ -Wert<sup>□</sup> zwar schlechter, liegt aber in derselben Größenordnung wie die für PEP **1** mit den beiden *N*-Acetylneuraminsäuresynthasen  $\text{NeuS}_{Nme}$  und  $\text{NeuS}_{Cje}$  bestimmten  $K_M$ -Werte. Der ermittelte  $k_{cat}$ -Wert für PEP **1** ist jedoch mit 1,5\*10<sup>-1</sup>/s in der gleichen Größenordnung wie der für die  $\text{NeuS}_{Cje}$  und einen Faktor drei schlechter als für die  $\text{NeuS}_{Nme}$ . Die Pseudaminsäuresynthase  $\text{PseS}_{Cje}$  zeigt eine gewisse Flexibilität, was die Modifikation und Substitution der Seitenkette am Amidstickstoffatom bei den Galactosaminderivaten betrifft. Auch die Änderung der konfigurativen Grundstruktur des Zuckers von der *galacto*- in die *gluco*-Konfiguration wird von der Synthase toleriert, wie am Beispiel von *N*-Acetylglucosamin **10** gezeigt ist. Auch in präparativen Synthesen ausgehend von *N*-Acetylglucosamin **10**, *N*-Acetylgalactosamin **18** und *N*-Methoxycarbonylgalactosamin **20** als Substraten konnten mit der  $\text{PseS}_{Cje}$  die entsprechenden Sialinsäuren synthetisiert und isoliert werden.

Die Palette der von der Synthase akzeptierten *gluco*-konfigurierten Aminosukkerderivate könnte eventuell noch größer sein, auch wenn im Rahmen dieser Arbeit bei keinem der vermessen Glucosaminderivate **11-15** verwertbare Messkurven erhalten werden konnten. Die durchgeführten Messungen mit Konzentrationen an Glucosaminderivaten zwischen 0-500 mM und eingesetzten Mengen an  $\text{PseS}_{Cje}$  von bis zu 400 µg pro Probe zeigten nur eine

---

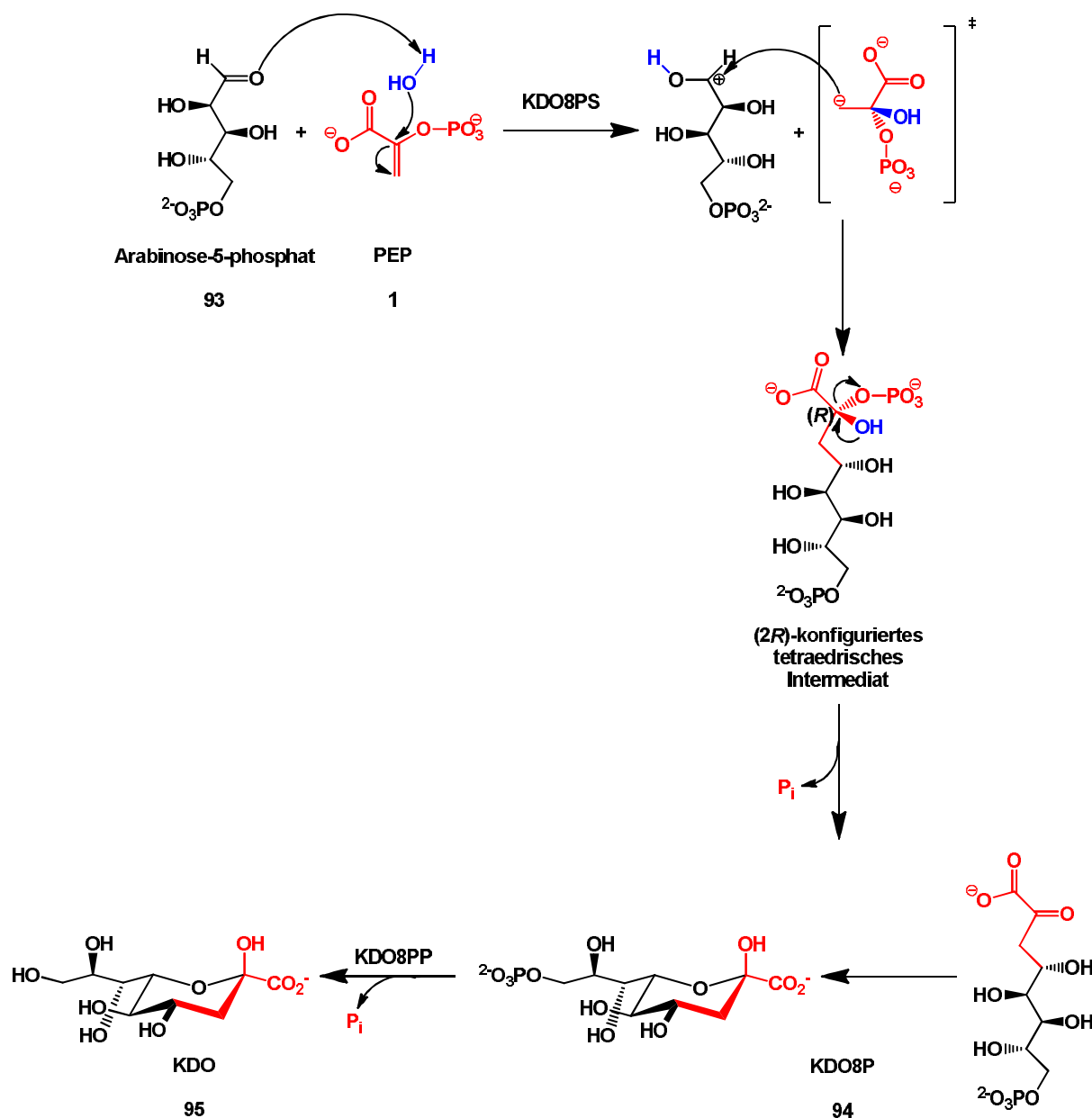
sehr schwache und langsame Absorptionsabnahme, die aus der natürlichen Hintergrundreaktion von NADH in wässriger Lösung resultierte. Weitergehende Untersuchungen in dieser Richtung unterlagen auch einigen limitierenden Faktoren. Hier ist zum einen die Begrenzung des Messvolumens auf 200 µl pro Well zu erwähnen, was eine Steigerung der Endkonzentration an Glucosaminderivaten über 500 mM schwierig macht vor allem auf Grund der begrenzten Löslichkeit in wässrigen Lösungen. Eine andere Möglichkeit das System zu optimieren ohne die Konzentrationen der Substrate zu verändern, wäre es die Menge an PseS<sub>Cje</sub> für einzelne Messungen zu erhöhen. Hier ist die Menge an verfügbarer PseS<sub>Cje</sub> der limitierende Faktor, da das zur Herstellung des Enzyms verwendete Verfahren zwar für den Labormaßstab optimiert ist, welches aber noch keine größeren Mengen an PseS<sub>Cje</sub> verfügbar macht.

#### 3.4.10 Interpretation der kinetischen Ergebnisse anhand der Proteinstrukturen

Um die aus dem gekoppelten kontinuierlichen Enzym-Assay gewonnen kinetischen Daten interpretieren zu können, wurden die Strukturen der PEP-abhängigen Sialinsäuresynthasen näher untersucht und miteinander verglichen. Für die *N*-Acetylneuramisäuresynthase aus *Neisseria meningitidis* gibt es inzwischen verschiedene Kristallstrukturen, an denen detaillierte Untersuchungen der *active-site* und dem Ablauf der katalytischen Reaktion durchgeführt wurden<sup>[1]</sup>. Die Gruppe um *Wakarchuk*<sup>[30]</sup> kristallisierte NeuS<sub>Nme</sub> im Komplex mit PEP, Mn<sup>2+</sup> und einem reduzierten, dem natürlichen Substrat strukturell entsprechenden *N*-Acetylmannosaminitol (PDB-Code 1XUZ). Um noch detailliertere Untersuchungen der katalysierten Reaktion durchzuführen, gelang es der Gruppe um *Tanner*<sup>[55]</sup> die *N*-Acetylneuramisäuresynthase NeuS<sub>Nme</sub> im Komplex mit einem tetraedrischen Intermediatanalogon zu kristallisieren (PDB-Code 2WQP). Zwei weitere, zu dieser Klasse der PEP-abhängigen Synthasen gehörende Enzyme, von denen schon etablierte Kristallstrukturen existieren, nämlich die 2-Keto-3-deoxy-D-manno-octulosonsäure-8-phosphatsynthase (KDO8PS, EC 2.5.1.55)<sup>[135]</sup> und die 2-Keto-3-deoxy-D-arabino-7-phosphoheptulosonsynthase (DAH7PS, EC 2.5.1.54)<sup>[67]</sup> wurden für diese Untersuchungen ebenfalls hinzugezogen. Für den nachfolgenden Sequenzvergleich und den phylogenetischen Stammbaum wurden die für KDO8PS und DAH7PS entsprechenden DNA- und Aminosäuresequenzen aus *Neisseria meningitidis* verwendet.<sup>[67, 135]</sup> Für den Vergleich der

---

Proteinstrukturen mit den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten PEP-abhängigen Synthesen wurde auf bestätigte Kristallstrukturen von der KDO8PS aus *Aquifex aeolicus* (PDB-Code 2A2I)<sup>[136]</sup> bzw. der DAH7PS aus *Thermatoga maritima* (PDB-Code 1RZM)<sup>[65]</sup> zurück gegriffen, diese sind strukturell identisch denen in *Neisseria meningitidis* wurden jedoch in Anwesenheit der jeweiligen natürlichen Substrate kristallisiert. Die aktuell aus *Neisseria meningitidis* verfügbaren Kristallstrukturen sind ohne die natürlichen Substrate kristallisiert worden, oder enthalten entsprechende Mutationen in der *active-site*.<sup>[67, 137]</sup> Die beiden PEP-abhängigen Synthesen sind in einigen Mikroorganismen u. a. in *Neisseria meningitidis* an weiteren wichtigen metabolischen Kaskaden beteiligt. So katalysiert die KDO8PS den vorletzten Schritt im KDO-Biosyntheseweg, die Kondensation von Arabinose-5-Phosphat **93** und PEP **1** zu KDO8P **94**. **94** wird im letzten Schritt durch eine Phosphatase zu KDO **95** hydrolysiert (Schema 3.31).<sup>[138]</sup> DAH7PS katalysiert den Auftaktschritt im Shikimatweg zu aromatischen Aminosäuren, wie Phenylalanin oder Tyrosin, die Kondensationsreaktion von Erythrose-4-Phosphat **96** und PEP **1** zu DAH7P **97**.<sup>[139]</sup> Diese Kondensationsreaktion verläuft mechanistisch analog der in Schema 3.31 für die KDO8PS dargestellten.



**Schema 3.31:** Mechanismus der von KDO8PS katalysierten Kondensationsreaktion zwischen Arabinose-5-phosphat **93** und Phosphoenolpyruvat **1**. Die Kondensationsreaktion verläuft stereospezifisch unter Ausbildung eines *R*-konfigurierten tetraedrischen Intermediats.<sup>[138]</sup>

Die von der KDO8PS katalysierte Reaktion verläuft analog der von NeuS<sub>Nme</sub> katalysierte Reaktion stereospezifisch. Einen Unterschied gibt es im Auftaktschritt<sup>[138]</sup>, in der von NeuS<sub>Nme</sub> katalysierten Reaktion erfolgt zunächst ein *si*-Seitenangriff des vinyllischen C3-Atoms von PEP auf die *re*-Seite des Carbonyl-C1-Atoms des in der offenkettigen Form vorliegenden ManNAc **2** unter Ausbildung eines Oxocarbeniumions. Dieses wird dann nucleophil von einem Wassermolekül angegriffen und es bildet sich das tetramediäre Intermediat aus. Im für die von der KDO8PS-katalysierten Reaktion vorgeschlagenen Mechanismus wird zunächst das Carbonylsauerstoffatom des Arabinose-5-phosphates **93**

---

protoniert und das vinyliche C2-Atom von PEP **1** von einem Wassermolekül über die *si*-Seite nucleophil angegriffen unter Ausbildung eines transienten Carbanions. Dieses Carbanion attackiert nun ebenfalls über einen *si*-Seitenangriff die *re*-Seite des Carbonyl-C1-Atoms des Arabinose-5-phosphates **93**.<sup>[136]</sup> Nach welchem Auftaktschritt sich das Intermediat in der von den PEP-abhängigen Synthesen katalysierten Kondensationereaktion ausbildet, ist schwer zu sagen, aufgrund der Instabilität und Kurzlebigkeit der transient gebildeten Vorstufen.

Da es aktuell keine Kristallstruktur der *N*-Acetylneuramisäuresynthase NeuS<sub>Cje</sub>, der Pseudaminsäuresynthase PseS<sub>Cje</sub> und des funktionell unbekannten NeuB2-Proteins aus *Campylobacter jejuni* gibt, wurden hierfür auf simulierte dreidimensionale Modelle zurückgegriffen. Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten simulierten 3D-Modelle wurden mit Hilfe der web-basierten SWISS-MODEL Software generiert.<sup>[140-142]</sup> SWISS-MODEL war die erste web-basierte, vollständig automatisierte Methode zur Visualisierung von simulierten 3D-Proteinstrukturen ausgehend von der Aminosäuresequenz.<sup>[140]</sup> Zur Generierung dieser Strukturen verwendet SWISS-MODEL die „Homology protein structure modeling“-Methode.<sup>[141, 143]</sup> Diese Methode setzt sich aus verschiedenen Stufen zusammen, ausgehend von der Aminosäuresequenz des Zielproteins wird zunächst eine multiple Sequenzanalyse durchgeführt. Dabei werden in den Datenbanken Aminosäuresequenzen mit ähnlicher Sequenz des Zielproteins mit einander verglichen und die Aminosäuresequenz mit der höchsten signifikanten Ähnlichkeit als Template für die Simulation ausgewählt.<sup>[140-141]</sup> Auf der Basis werden im nächsten Schritt in der Simulation zunächst die strukturell konservierten Regionen des Zielproteins modelliert. Nicht konservierte Aminosäurenregionen werden *de novo* modelliert, unabhängig von den Informationen aus der Sequenzanalyse. Um die Geometrie der modellierten Struktur des Zielproteins festzulegen, werden danach molekulardynamische Methoden zur Minimierung der inneren Energie angewendet. Im abschließenden Schritt wird die modellierte Struktur noch auf mögliche Fehler und Ungenauigkeiten untersucht, dies können unter anderem eine fehlerhafte Sequenzanalyse oder die Auswahl eines falschen Templates sein. Um diese zu finden und zu entfernen wendet SWISS-MODEL „model quality estimation methods“ an.<sup>[142]</sup> Die Visualisierung des 3D-Modells des Zielproteins und die Interpretation erfolgt mit Hilfe des 3D-Grafikprogrammes „PyMOL Molecular Graphics System“.<sup>[144]</sup>

Zunächst wurden die jeweiligen Proteinsequenzen miteinander hinsichtlich ihrer Ähnlichkeit zu einander verglichen (Tabelle 3.25).

**Tabelle 3.25:** Überblick über die Resultate des Aminosäuresequenzvergleiches zwischen den einzelnen PEP-abhängigen Synthasen.

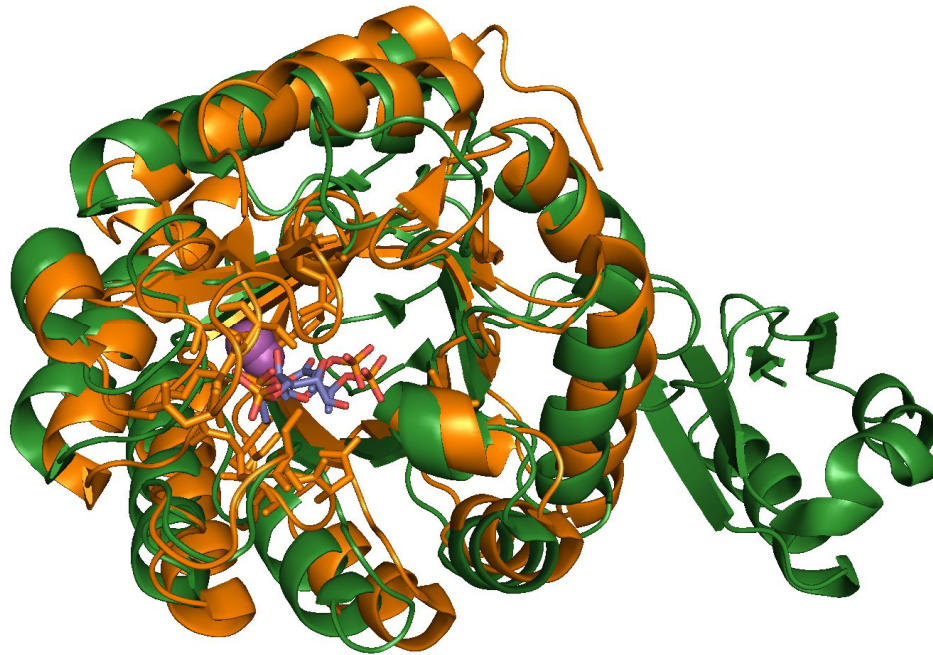
	NeuS <sub>Nme</sub>	NeuS <sub>Cje</sub>	PseS <sub>Cje</sub>	NeuB2 <sub>Cje</sub>	DAH7PS <sub>Nme</sub>	KDO8PS <sub>Nme</sub>
NeuS <sub>Nme</sub>		58,5	34,8	32,3	16,1	17,7
NeuS <sub>Cje</sub>	58,5		33,8	35,1	16,4	16,7
PseS <sub>Cje</sub>	34,8	33,8		34,3	13,3	17,9
NeuB2 <sub>Cje</sub>	32,3	35,1	34,3		15,2	16,5
DAH7PS <sub>Nme</sub>	16,1	16,4	13,3	15,2		19,6
KDO8PS <sub>Nme</sub>	17,7	16,7	17,9	16,5	19,6	

Die höchste Ähnlichkeit in der Sequenzanalyse zeigen die beiden *N*-Acetylneuraminsäuresynthasen NeuS<sub>Nme</sub> und NeuS<sub>Cje</sub> mit fast 60 Prozent Identität. Die beiden anderen aus *Campylobacter jejuni* stammenden PEP-abhängigen Synthasen PseS<sub>Cje</sub> und NeuB2 besitzen zu den beiden *N*-Acetylneuraminsäuresynthasen NeuS<sub>Nme</sub> und NeuS<sub>Cje</sub> eine ähnliche Sequenzidentität von etwas über 30 Prozent. Untereinander weisen die beiden Synthasen PseS<sub>Cje</sub> und NeuB2 jedoch nicht die aus dem Vergleich mit den beiden *N*-Acetylneuraminsäuresynthasen erwartete große Sequenzidentität auf, sie ähneln sich ebenfalls nur zu 30 Prozent.

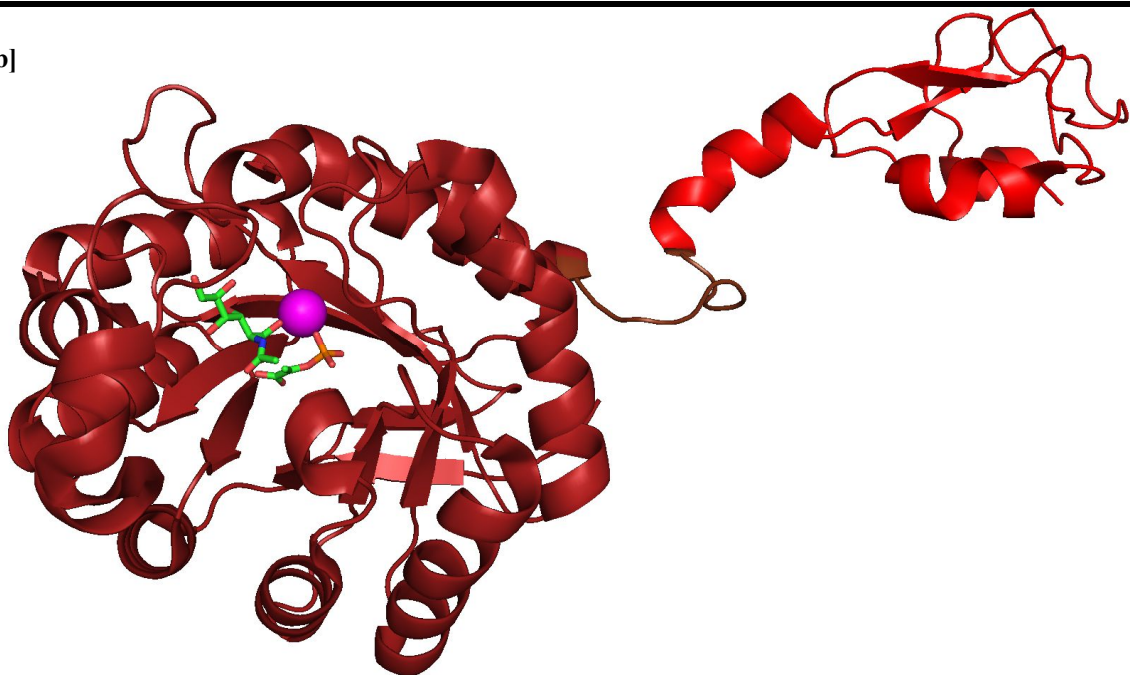
Der Sequenzvergleich mit den beiden anderen PEP-abhängigen Synthasen KDO8PS und DAH7PS lieferte wie erwartet nur noch eine sehr geringe Identitätsübereinstimmung, was nach dem Vergleich der Kristallstrukturen auch zu erwarten war. Strukturell unterscheidet sich die NeuS<sub>Nme</sub> deutlich von der KDO8PS und der DAH7PS. Abbildung 3.40 zeigt im Vergleich je eine monomere Untereinheit von NeuS<sub>Nme</sub><sup>[30]</sup>, DAH7PS<sup>[65]</sup> und KDO8PS<sup>[136]</sup>.



[a]



[b]

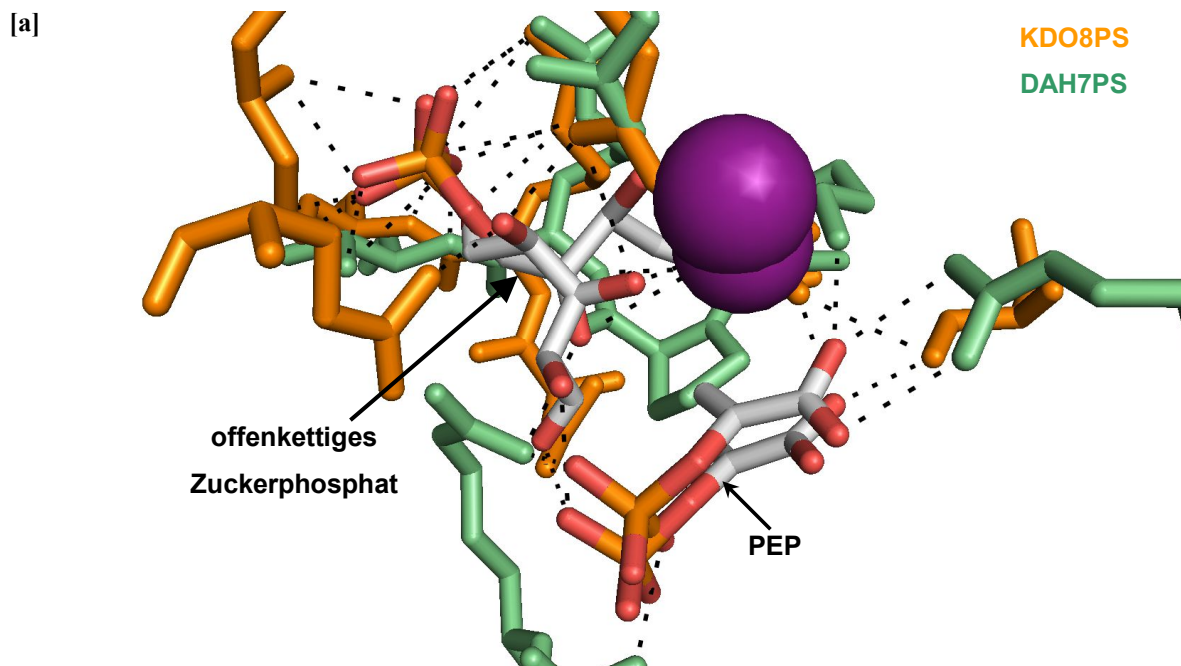


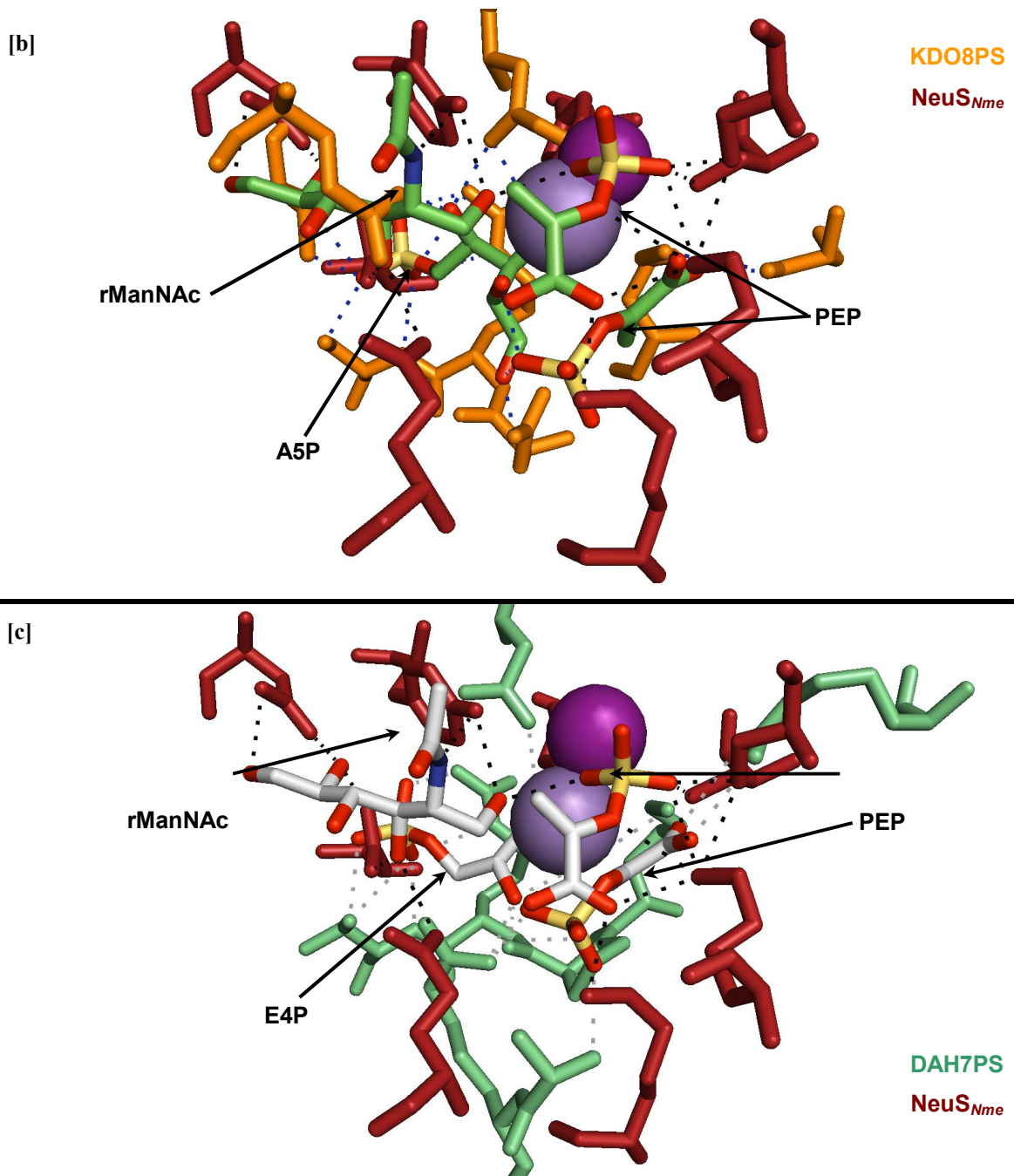
**Abbildung 3.39:** Struktur und tertiäres Faltungsmuster der PEP-abhängigen Synthasen [a] **KDO8PS** (PDB-Code 2A2I)<sup>[136]</sup> und **DAH7PS** (PDB-Code 1RZM)<sup>[65]</sup>, [b] **NeuS<sub>Nme</sub>** (PDB-Code 1XUZ)<sup>[30]</sup> im Vergleich.

Eine Untereinheit der homodimeren *N*-Acetylneuraminsäuresynthase NeuS<sub>Nme</sub> stellt ein längliches Makromolekül dar, dessen beiden Domänen ein  $(\alpha/\beta)_8$ -Fass mit der *active-site* und eine AFP-III-proteinähnliche Einheit über eine Linkerregion miteinander verknüpft sind.<sup>[30]</sup> Dagegen ist das strukturelle Faltungsmuster einer Untereinheit der homotetrameren KDO8PS

ringförmig einem Donut ähnlich, bestehend aus einem achtsträngigen parallelen  $\beta$ -Fass, welches von weiteren acht Helices umgeben ist und sich somit als Faltungsmuster ein  $(\alpha/\beta)_8$ -Fass ergibt.<sup>[136]</sup> Das Faltungsmuster der DAH7PS entspricht dem der KDO8PS, zusätzlich besitzt die DAH7PS jedoch noch ein weiteres Faltungsmotiv das ausserhalb der ringförmigen Domäne liegt. Da die von diesen strukturell unterschiedlichen PEP-abhängigen Enzymen, katalysierten Kondensationsreaktionen nach demselben Mechanismus verlaufen, werden die jeweiligen *active-sites* der Enzyme detailliert miteinander verglichen.

Zum Vergleich der *active-sites* wurden von den jeweiligen Enzymen die Kristallstrukturen mit den entsprechenden Substraten herangezogen, für NeuS<sub>Nme</sub> mit dem reduzierten Substratanalogon rManNAc (PDB-Code 1XUZ)<sup>[30]</sup>, für KDO8PS mit dem natürlichen Substrat Arabinose-5-phosphat (PDB-Code 2A2I)<sup>[136]</sup> und DAH7PS mit dem natürlichen Substrat Erythrose-4-phosphat (PDB-Code 1RZM).<sup>[65]</sup> Abbildung 3.40 zeigt die jeweiligen *active-sites* mit den beteiligten Aminosäureresten.





**Abbildung 3.40:** Vergleich der *active-sites* der PEP-abhängigen Synthasen [a] KDO8PS und DAH7PS überlagert, [b] NeuS<sub>Nme</sub> mit KDO8PS und [c] NeuS<sub>Nme</sub> mit DAH7PS. Für einen besseren Vergleich der jeweiligen *active-sites* wurde versucht die jeweiligen Substrate übereinander zu legen. Aufgrund der Farbcodierung der einzelnen Enzyme sind die Kohlenstoffketten der Substrate in [a] und [c] hellgrau und in [b] grün dargestellt.

In Abbildung 3.40 [a] sind die beiden *active-sites* der KDO8PS und der DAH7PS überlagert dargestellt. In dieser Darstellung erkennt man gut, dass in beiden Enzymen die jeweiligen Substrate und das Metallion in der Tasche der *active-site* fast identisch angeordnet sind. Das PEP-Molekül wird über polare Wechselwirkungen mit den Aminosäureresten so stabilisiert

---

und ausgerichtet, dass seine vinylische Gruppe in geringer Entfernung zur C1-Carbonylgruppe des entsprechenden Substrates lokalisiert ist. Auch die jeweilige Phosphatgruppe der Substrate wird stark durch polare Wechselwirkungen stabilisiert und sorgt mit für die korrekte Ausrichtung des zweiten Substrates. Abbildung 3.40 [b] zeigt den Vergleich der *active-sites* von NeuS<sub>Nme</sub> und KDO8PS miteinander. Die räumliche Lage der Substrate (rManNAc und PEP für NeuS<sub>Nme</sub> sowie A5P und PEP für KDO8PS) in der jeweiligen *active-site* ist fast identisch. Das PEP-Molekül in NeuS<sub>Nme</sub> ist in derselben Region der Tasche lokalisiert, wie das PEP-Molekül in KDO8PS, jedoch ist seine Ausrichtung anders. Der Grund für die Umorientierung des PEP-Moleküls in der *active-site* von NeuS<sub>Nme</sub> hängt mit der Position des zweiten natürlichen Substrates rManNAc zusammen. Dieses ist an einer anderen Stelle in der *active-site* positioniert als es das Arabinose-5-phosphat in KDO8PS ist. Ohne eine Umorientierung des PEP-Moleküls in der *active-site* von NeuS<sub>Nme</sub> wäre die Distanz der vinylischen C3-Gruppe des PEP zur C1-Carbonylgruppe des rManNAc zu groß für die Reaktion. Die veränderte Lage des rManNAc in NeuS<sub>Nme</sub> ist darin begründet, dass im Gegensatz zur KDO8PS an der katalytischen Reaktion der NeuS<sub>Nme</sub> nicht nur Aminosäurereste aus der Tasche der *active-site* beteiligt sind, sondern für die katalytische Aktivität der NeuS<sub>Nme</sub> ist noch eine weitere Aminosäure Arg314 notwendig, die in der zweiten gegenüberliegenden monomeren Untereinheit in der AFP-III-Domäne lokalisiert ist.<sup>[56]</sup> Der Guanidiniumrest in der Seitenkette des Arginin314 stabilisiert durch polare Wechselwirkungen den Carbonylsauerstoff der *N*-Acetylseitenketten des rManNAc während der Reaktion und ist wie das zweiwertige Metallion essentiell für die Aktivität der NeuS<sub>Nme</sub>. Ohne eine geometrische bzw. konformationelle Änderung in der Tasche mit der *active-site* wäre diese Stabilisierung durch den Guanidiniumrest des Arg314 nicht möglich. Die Beteiligung einer weiteren Aminosäure aus der gegenüberliegenden Untereinheit, welche essentiell für die katalysierte Reaktion ist, unterscheidet die NeuS<sub>Nme</sub> von der KDO8PS. In Abbildung 3.40 [c] sind die *active-sites* von NeuS<sub>Nme</sub> und DAH7PS überlagert dargestellt, hier erhält man das gleiche Resultat wie aus dem Vergleich von NeuS<sub>Nme</sub> mit KDO8PS.

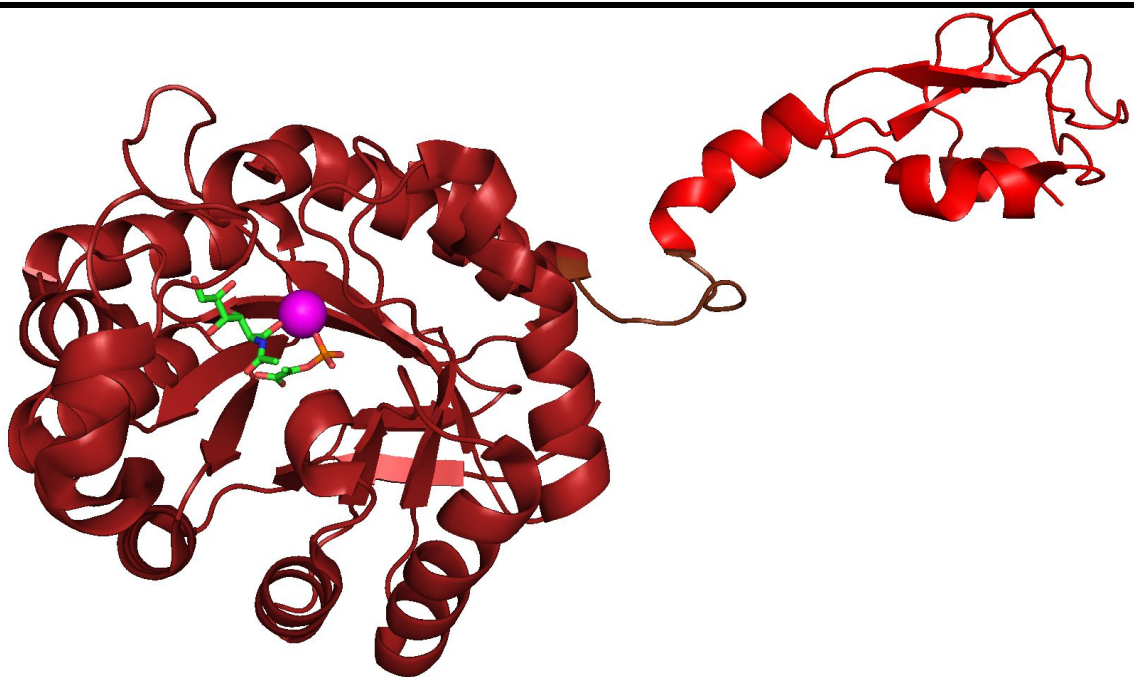
Obwohl NeuB2<sup>[73]</sup> in der Sequenzanalyse noch eine Identität von über 30 Prozent zu der *N*-Acetylneuraminsäuresynthase NeuS<sub>Nme</sub> aufweist, unterscheidet sich die berechnete simulierte 3D-Struktur des NeuB2-Proteins unerwartet komplett von den simulierten 3D-Strukturen von NeuS<sub>Cje</sub> und PseS<sub>Cje</sub> bzw der experimentellen Struktur von NeuS<sub>Nme</sub> (Abbildung 3.41).



[a]



[b]

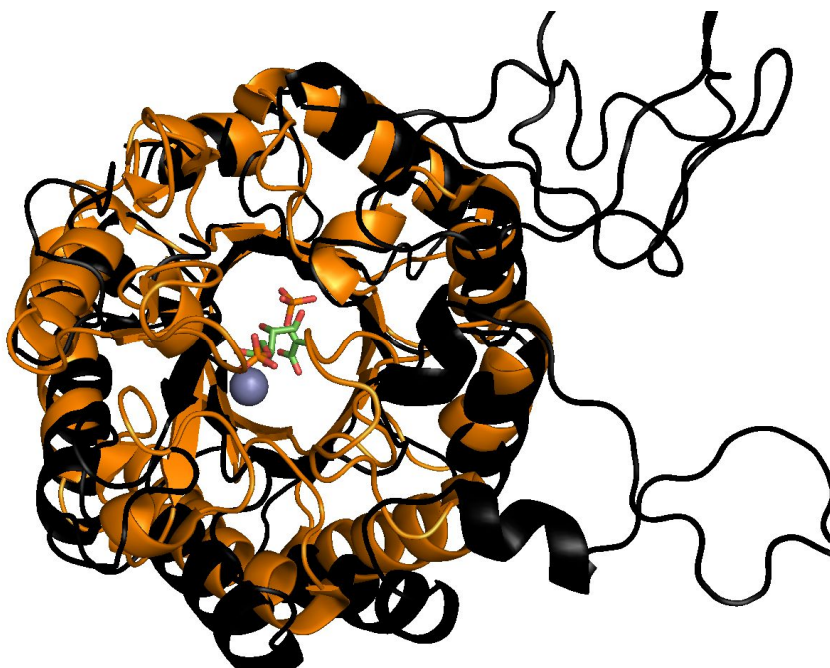


**Abbildung 3.41:** Simulierte 3D-Struktur von [a] NeuB2-Protein im Vergleich zu [b] der experimentellen Struktur von NeuS<sub>Nme</sub> (PDB-Code 1XUZ ).

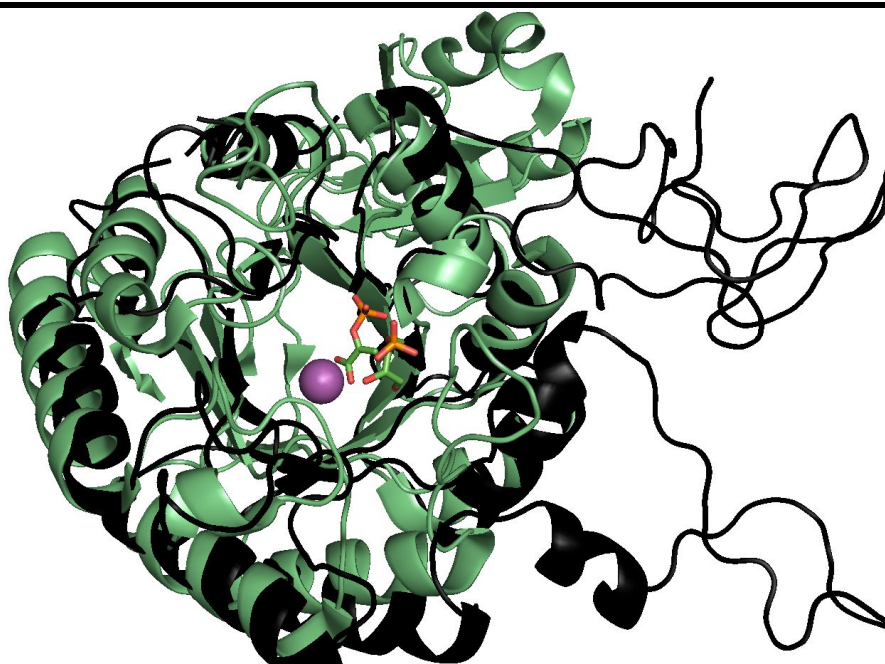
Die für *N*-Acetylneuraminsäure-Synthasen typische AFP-III- ähnliche Dömane fehlt in der simulierten Struktur des NeuB2-Proteins gänzlich. Das Struktur und Faltungsmotiv im N-terminalen Teil entspricht ebenfalls einem  $(\alpha/\beta)_8$ -Fass. Desweiteren besitzt das

NeuB2-Protein noch eine weitere Region am C-terminalen Ende, über deren Faltungsmuster ist jedoch für eine zuverlässig simulierte Struktur die Information zu gering. Im Hinblick auf die in den Testsynthesen gegenüber ManNAc **2**, GlcNAc **10** und GalNAc **18** festgestellte Inaktivität des NeuB2-Proteins und der strukturellen Inkompatibilität mit den NeuS-Enzymen wurde die simulierte Struktur der NeuB2 mit den beiden bekannten Kristallstrukturen der PEP-abhängigen Enzyme KDO8PS (aus *Aquifex aeolicus*; PDB-Code 2A2I)<sup>[136]</sup> und DAH7PS (aus *Thermatoga maritima*; PDB-Code 1RZM)<sup>[65]</sup> verglichen (Abbildung 3.42).

[a]

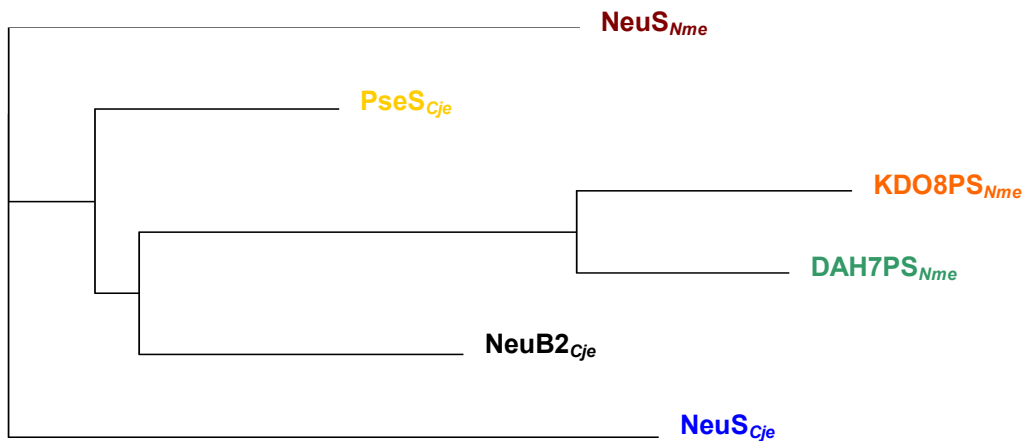


[b]



**Abbildung 3.42:** Vergleich der tertiären Faltungsmotive der simulierten Struktur von NeuB2 mit [a] der **KDO8PS** (PDB-Code 2A2I) und [b] der **DAH7PS** (PDB-Code 1RZM).

In Abbildung 3.42 sind die Tertiär-Strukturen von NeuB2 mit KDO8PS [a] und DAH7PS [b] überlagert dargestellt. Die Lage und Ausrichtung des achtsträngigen parallelen  $\beta$ -Fasses von NeuB2 ist sowohl mit dem der KDO8PS als auch der DAH7PS praktisch identisch. Die das  $\beta$ -Fass umgebenden acht  $\alpha$ -Helices von NeuB2 überlagern sich ebenfalls fast identisch mit denen der beiden Röntgenkristallstrukturen. Die Position der *active-site* von KDO8PS und DAH7PS wird in der Abbildung 3.42 durch die Lage der natürlichen Substrate und dem zweiwertigen Metallion verdeutlicht. Positioniert man die natürlichen Substrate der KDO8PS Arabinose-5-phosphat **93** und PEP **1** deckungsgleich in der simulierten Struktur von NeuB2, dann liegen diese auch am Eingang zu einer großen offenen Vertiefung, was die Tasche mit der *active-site* von NeuB2 sein könnte. Eine nähere Inspektion der NeuB2 zeigt, dass es in dieser Region jedoch fast keine Aminosäurereste gibt, die in einer katalytischen Reaktion durch polare Wechselwirkungen für die Stabilisierung und korrekte Ausrichtung der Substrate sorgen könnten. Vor dem Eingang zu der Vertiefung hat die NeuB2 keine aus dem  $\alpha_8$ -Helixstrukturmotiv stammenden Linkerregionen, welche stabilisierend an einer katalytischen Reaktion beteiligt sein können, im Gegensatz zu den beiden anderen Enzymen. Eine genaue Aussage über die wirkliche Funktion von NeuB2 alleine aus der simulierten Struktur ist aufgrund der unsicheren Informationslage nicht möglich. Da *Campylobacter jejuni* jedoch schon eine KDO8PS besitzt, ist auszuschließen, dass NeuB2 an diesem Biosyntheseweg beteiligt ist. Um eine mögliche Aussage über die Art und Funktionsweise der NeuB2 treffen zu können, wurde ein phylogenetischer Stammbaum erstellt. Für diesen Stammbaum wurden neben der NeuB2 die anderen PEP-abhängigen Synthasen NeuS<sub>Nme</sub>, NeuS<sub>Cje</sub>, PseS<sub>Cje</sub>, KDO8PS<sub>Nme</sub> und DAH7PS<sub>Nme</sub> verwendet.

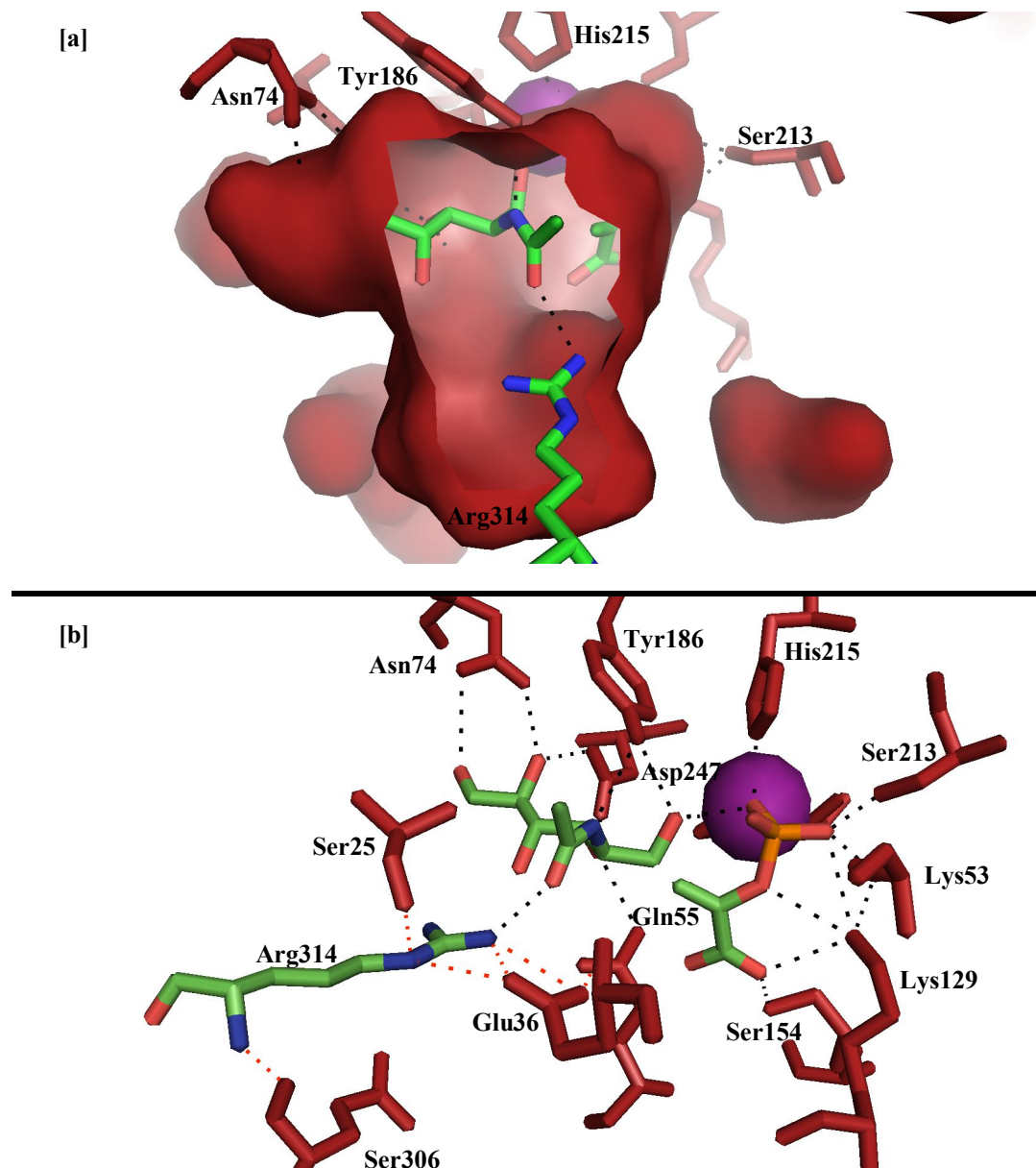


**Abbildung 3.43:** Phylogenetischer Stammbaum der PEP-abhängigen Synthasen, erstellt auf Basis einer vergleichenden Primärsequenzanalyse der Synthasen. Der Stammbaum wurde mit dem Programm BioEdit<sup>[145]</sup> unter Verwendung der neighbour-joining-Methode erstellt.

In Abbildung 3.43 ist dieser phylogenetische Stammbaum der PEP-abhängigen Synthasen gezeigt. Die Basis ist eine Primärsequenzanalyse der DNA-Sequenzen aller untersuchten PEP-abhängigen Synthasen, auf dieser mit der neighbour-joining-Methode<sup>[146-147]</sup> der Stammbaum erstellt wurde. Alle Synthasen haben einen gemeinsamen evolutionären Vorfahren. Aus diesem haben sich die beiden *N*-Acetylneuraminsäuresynthasen **NeuS<sub>Nme</sub>** und **NeuS<sub>Cje</sub>** divergent entwickelt. Daneben entwickelte sich relativ zeitnahe im Laufe der Evolution auch die Pseudaminsäuresynthase **PseS<sub>Cje</sub>** aus diesem Vorläufer, was die Ähnlichkeiten zu den beiden *N*-Acetylneuraminsäuresynthasen **NeuS<sub>Nme</sub>** und **NeuS<sub>Cje</sub>** bezüglich der Tertiärstruktur und der katalysierten Reaktion erklärt. Erst später entwickelten sich offenbar die beiden PEP-abhängigen Synthasen **KDO8PS** und **DAH7PS** aus einem gemeinsamen Vorläufer, parallel zu diesem entwickelte sich NeuB2. Die beiden jüngsten Synthasen **KDO8PS** und **DAH7PS** sind nicht für die Synthese von C<sub>9</sub>-Zuckern, sondern von C<sub>7</sub>- und C<sub>8</sub>-Zuckern. Das natürliche Substrat für das NeuB2-Protein ist unbekannt, das Produkt könnte ein C<sub>7</sub>-C<sub>9</sub>-Zucker sein. Die Ergebnisse aus diesem phylogenetischen Stammbaum passen gut zum Gesamtbild der erhaltenen Ergebnisse aus dem kinetischen Assay und den jeweiligen Strukturvergleichen.



Die simulierte Kristallstruktur der *N*-Acetylneuraminsäuresynthase NeuS<sub>Cje</sub> ist in ihrer tertiären Struktur für die *active-site* faktisch identisch mit der experimentellen Struktur von NeuS<sub>Nme</sub>. Für die Interpretation der kinetischen Ergebnisse aus dem kontinuierlichen Assay wurden die *active-sites* der beiden *N*-Acetylneuraminsäuresynthasen NeuS<sub>Nme</sub> (PDB-Code 1XUZ)<sup>[30]</sup> und der simulierten NeuS<sub>Cje</sub> näher betrachtet. In Abbildung 3.44 ist die *active-site* der NeuS<sub>Nme</sub> im Detail gezeigt.



**Abbildung 3.44:** Detaillierte Ansicht der *active-site* von NeuS<sub>Nme</sub> [a] Blick durch den Eingang der Tasche in die *active-site* und [b] Darstellung aller an der katalytischen Reaktion durch polare Wechselwirkungen beteiligten Aminosäuren. Die beiden Substrate rManNAc, PEP sowie das Arg314 sind in grün und das zweiwertige Mangan in violett dargestellt.

---

In Abbildung 3.44 [a] ist der Blick durch die Öffnung der Tasche in die *active-site* der NeuS<sub>Nme</sub> gezeigt. In der Tasche befindet sich links das reduzierte *N*-Acetylmannosaminitol, als Substratanalogon für das natürliche Substrat ManNAc **2**. Rechts hinten in der Kavität ist das zweite natürliche Substrat PEP **1** mit dem essentiellen Metallkation Mn<sup>2+</sup> lokalisiert. In der homodimeren Struktur der *N*-Acetylneuraminsäuresynthase NeuS<sub>Nme</sub> wird der Eingang zur Kavität durch die AFP-III-ähnliche Domäne des gegenüberliegenden Monomeren verschlossen und somit die Reaktion von äusserlichen Störeinflüssen abgeschirmt. In Abbildung 3.44 [a] ist das für die katalytische Reaktion essentielle Arg314 so orientiert, dass durch polare Wechselwirkungen die *N*-Acetylgruppe des rManNAc, als Vertreter für das natürliche Substrat ManNAc **2**, für die Reaktion in der korrekten Position fixiert wird. In Abbildung 3.44 [b] sind alle an der katalytischen Reaktion über polare Wechselwirkungen beteiligten Aminosäuren gezeigt. Neben den direkt an der katalytischen Reaktion beteiligten sind zusätzlich noch die jeweiligen Aminosäuren gezeigt, welche das Arginin 314 durch polare Wechselwirkungen stabilisieren und ausrichten. Bis auf eine Ausnahme stammen alle diese Aminosäuren aus derselben Untereinheit, in der die gezeigte *active-site* liegt, nur eine Aminosäure liegt in der AFP-III-ähnlichen Domäne der zweiten Untereinheit.

Durch die Geometrie und die Größe der Tasche um die *active-site* lässt sich gut die Flexibilität und große Substrattoleranz der *N*-Acetylneuraminsäuresynthase NeuS<sub>Nme</sub> erklären. Eine Seitenkettenverlängerung der *N*-Acetylgruppe um zwei Kohlenstoffatome erscheint räumlich ohne größere Probleme möglich. Zwischen der terminalen Methylgruppe in der *N*-Acetylseitenkette und einem die *active-site* begrenzenden Methioninrest liegt eine Entfernung von 1,5 Å. Dies wird auch durch die Ergebnisse bestätigt, welche die Gruppe um Sundaram<sup>[58]</sup> bei kinetischen Untersuchungen mit NeuS<sub>Nme</sub> gemacht hat, wobei die Toleranz der NeuS<sub>Nme</sub> gegen eine aliphatische Seitenkettenverlängerung bis zu einem *N*-Pentanoylmannosamin untersucht wurde<sup>[1]</sup>. Mit jeder zusätzlichen Methyleneinheit in der Seitenkette sinkt die Affinität der NeuS<sub>Nme</sub> sukzessive ab. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden für die kinetischen Studien mit Ausnahmen des *N*-Azidoacetylmannosamins **8** nur solche *N*-modifizierten Mannosaminderivate verwendet, deren Seitenkette nur um ein Nicht-H-Atom verlängert war, allerdings wurden durch Heteroatome in der Seitenkette deren sterische und elektronischen Eigenschaften verändert. Die Ergebnisse aus den kinetischen Studien mit den *N*-modifizierten Mannosaminderivaten **3-9** gehen mit denen aus der Struktur gewonnenen Informationen nahezu konform. Die Affinität und Aktivität der NeuS<sub>Nme</sub> zu den modifizierten Mannosaminderivaten nimmt im Vergleich zum natürlichen Substrat mit steigendem Grad der Modifizierung in der Seitenkette um bis zu zwei Größenordnungen ab.

---

Sehr deutlich wird dies am Beispiel der Substrate *N*-Methoxycarbonylmannosamin **5** und *N*-Azidoacetylmannosamin **8**. Die Aktivität der NeuS<sub>Nme</sub> gegenüber diesen beiden Substraten liegt in derselben Größenordnung wie die Aktivität dem natürlichen Substrat gegenüber.

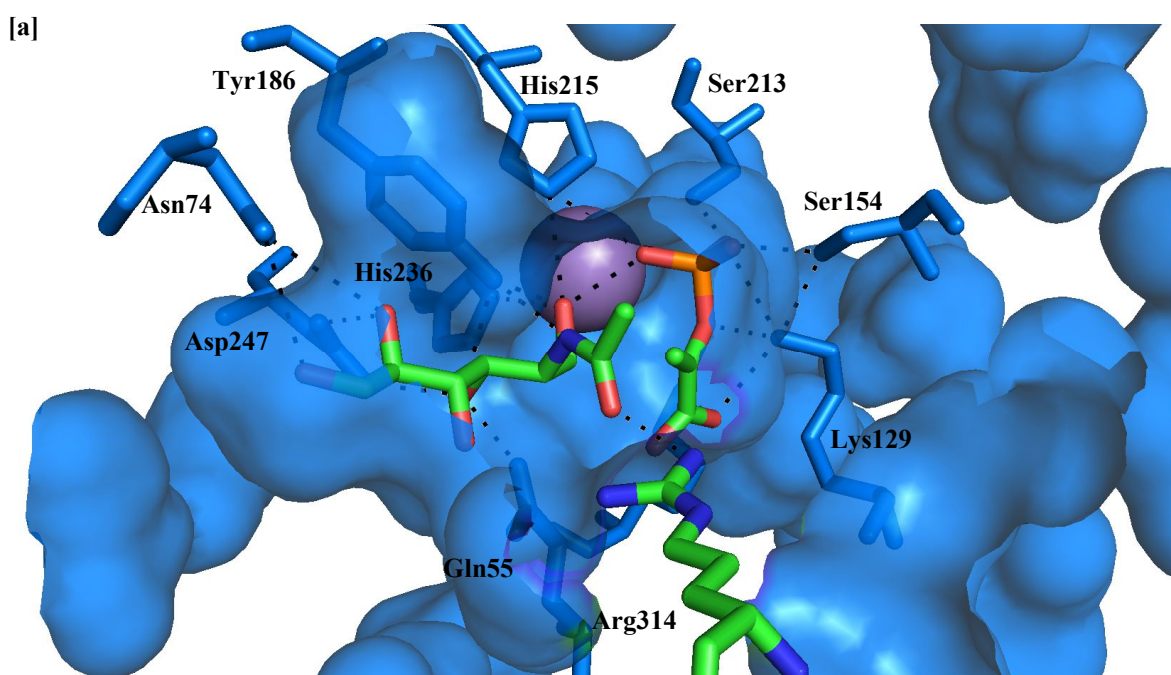
Allerdings sinkt die Affinität und die katalytische Effizienz der NeuS<sub>Nme</sub> zu den beiden Substraten *N*-Methoxycarbonylmannosamin **5** und *N*-Azidoacetylmannosamin **8** im Vergleich zu ManNAc **2** um zwei Größenordnungen ab. Durch das Einfügen des zusätzlichen Sauerstoffatoms in die Seitenkette von *N*-Methoxycarbonylmannosamin **5** kann die korrekte Ausrichtung des Substrates durch konkurrierende polare Wechselwirkungen mit dem Arg314 gehindert sein und die schlechteren Werte erklären. Dass das *N*-Azidoacetylmannosamin **8** als Substrat schlechter geeignet ist, lässt sich über den sterischen Anspruch der terminalen Azidfunktionalität erklären. Als ein unerwartet gutes Substrat stellte sich in den kinetischen Studien das *N*-Cloroacetylmannosamin **6** heraus, gegenüber dem die Affinität und auch die Aktivität der NeuS<sub>Nme</sub> im Vergleich zum natürlichen Substrat *N*-Acetylmannosamin **2** um einen Faktor zwei besser ist. Eine mögliche Erklärung dafür kann die Hydrolyseempfindlichkeit des *N*-Cloroacetylmannosamin **6** sein und es hier zu einer Konkurrenz zwischen diesem und *N*-Glykolylmannosamin **9** in einer Reaktion kommt.

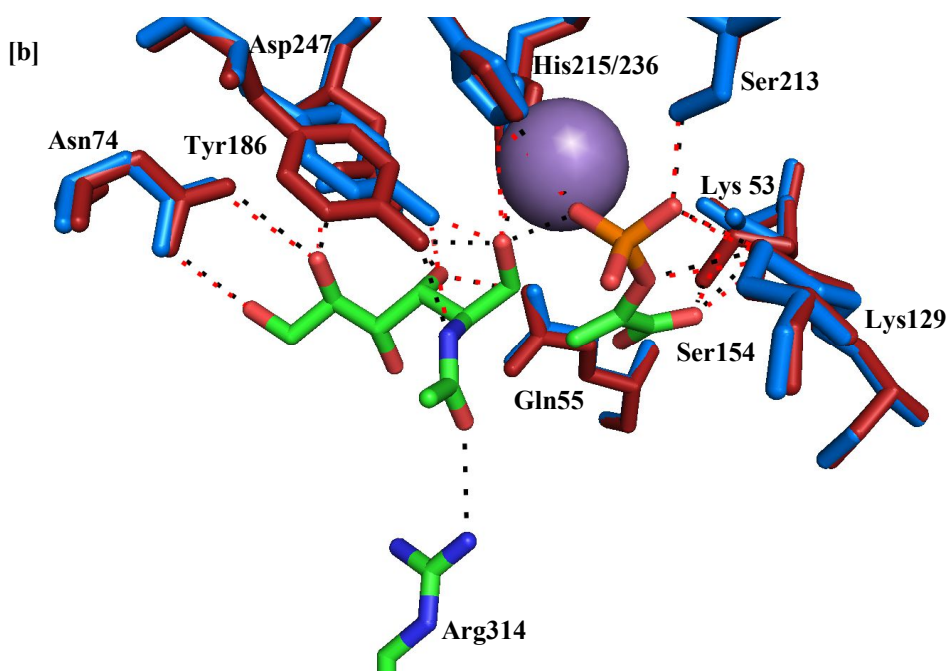
NeuS<sub>Nme</sub> toleriert neben der Seitenkettenverlängerung auch konfigurative Veränderungen im Substrat. Begünstigt wird dies durch die Größe der Tasche der *active-site*, in die *gluco*-konfigurierte *N*-acylierte Glucosaminderivate und *galacto*-konfigurierte Galactosaminderivate passen. Allerdings bewirkt die konfigurative Änderung an C2, dass diese Substrate nicht mehr optimal für die Reaktion positioniert und stabilisiert werden. Durch die freie Drehbarkeit der C-N-Bindung kann zwar noch in gewissem Maße durch polare Wechselwirkungen mit dem Arginin314 Stabilisierung erfolgen, diese ist aber nicht mehr so ausgeprägt wie bei den Mannosaminderivaten. Diese konfigurative Änderung lässt die Affinität, Aktivität und katalytische Effizienz der NeuS<sub>Nme</sub> um bis zu zwei Größenordnungen sinken. Der doppelte konfigurative Wechsel an C2- und C4-Position potenziert die Verschlechterung weiter, so dass im Vergleich zu den Mannosaminderivaten die katalytische Effizienz um bis zu fünf Größenordnungen geringer ausfällt.

Wie sich in den kinetischen Studien gezeigt hat beschränkt, sich die Substrattoleranz der *N*-Acetylneuraminsäuresynthase NeuS<sub>Nme</sub> nicht nur auf die oben erwähnten *N*-acylierten Aminosucker, sondern auch auf (Amino)-zucker, Deoxyzucker und andere Vertreter mit den entsprechenden Konfigurationen an C2-(*manno*-,*gluco*-) und C4-(*galacto*-)-Position. Durch das Fehlen der *N*-Acetylgruppe, und dem damit verbundenen Verlust an Stabilisierung, sind die meisten dieser Zucker schlechte Substrate, die aber noch in annehmbarem Maße von der

NeuS<sub>Nme</sub> akzeptiert werden. Die Anwesenheit einer funktionellen Gruppe an der C2-Position ist für die NeuS<sub>Nme</sub> nicht essentiell, da die beiden Deoxyzucker 2-Deoxy-D-glucose **42** und 2-Deoxy-D-galactose **43** umgesetzt werden. Vor allem Zucker, die konfiguratativ dem natürlichen Substrat *N*-Acetylmannosamin **2** entsprechen, wie das Mannosamin **33** oder Mannose **36**, sind noch unter den besten Substraten für die NeuS<sub>Nme</sub>. Zwei weitere Zucker aus dieser Gruppe stechen noch hervor, nämlich die 2-Deoxy-D-Ribose **44** und die D-Fucose **39**. Im Rahmen ihrer Arbeit hatte *Knorst* schon versucht, in präparativen Synthesen 2-Deoxy-D-Ribose **44** mit der NeuS<sub>Nme</sub> umzusetzen, konnte jedoch keinen Umsatz erzielen. Diese Ergebnisse legten die Vermutung nahe, dass durch die Konfigurationsänderung an der C3-Position der Ringschluß im Produkt nicht uneingeschränkt möglich ist. Dies wird durch die Ergebnisse aus der Untersuchung der 2-Deoxy-D-Ribose **44** mit dem gekoppelten Assay bestätigt, in dem die NeuS<sub>Nme</sub> diesen Deoxyzucker nicht als Substrat akzeptiert. Obwohl D-Fucose **39** sowohl konfiguratativ (*galacto*-Konfiguration) als auch strukturell (C6-Position deoxygeniert) weit vom natürlichen Substrat abweicht, ist die Affinität und die Aktivität der NeuS<sub>Nme</sub> zu diesem Zucker als Substrat nur eine bis zwei Größenordnung schlechter im Vergleich zu *N*-Acetylmannosamin **2**.

In den kinetischen Studien der NeuS<sub>Cje</sub> im gekoppelten kontinuierlichen Assay zeigte die *N*-Acetylneuraminsäuresynthase aus *Campylobacter jejuni* praktisch die gleiche breite Substrattoleranz wie die NeuS<sub>Nme</sub>. Da die Tertiärstrukturen der beiden Enzyme NeuS<sub>Cje</sub> und NeuS<sub>Nme</sub> nahezu identisch sind, wurden die beiden *active-sites* detaillierter miteinander verglichen. In Abbildung 3.45 ist die *active-site* mit allen beteiligten Aminosäuren dargestellt.



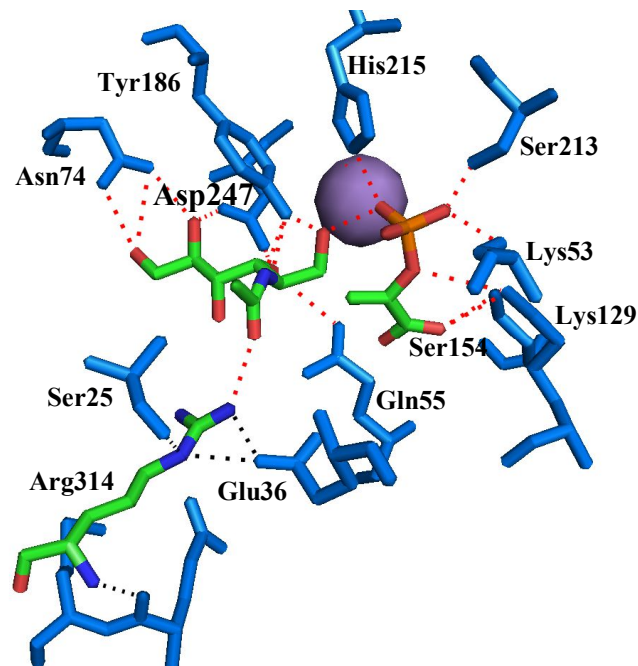


**Abbildung 3.45:** Detaillierter Vergleich der *active-sites* von  $\text{NeuS}_{Nme}$  und  $\text{NeuS}_{Cje}$ , **[a]** Blick durch den Eingang der Tasche in die *active-site* von  $\text{NeuS}_{Cje}$  (simuliertes Modell) und **[b]** vergleichende Darstellung aller durch polare Wechselwirkungen an der Reaktion beteiligten Aminosäuren. Die beiden Substrate rManNAc, PEP sowie das Arg314 sind in grün und das zweiwertige Mangan in violett dargestellt.

Abbildung 3.45 [a] zeigt die Tasche, in der die *active-site* von  $\text{NeuS}_{Cje}$  lokalisiert ist. Genau wie die Tasche der  $\text{NeuS}_{Nme}$  (Abb. 3.44 [a]) ist sie mit einer großen Öffnung versehen und bietet räumlich Platz für strukturelle und konfigurative Modifikationen am als Substrat verwendeten Zucker. Für die Untersuchung der *active-site* von  $\text{NeuS}_{Cje}$  wurde durch Überlagerung der experimentellen Struktur der  $\text{NeuS}_{Nme}$  mit der simulierten Struktur die Substrate an den bestätigten Positionen in der *active-site* von  $\text{NeuS}_{Cje}$  lokalisiert. Alle an der katalytischen Reaktion durch polare Wechselwirkungen beteiligten Aminosäuren finden sich in der simulierten Struktur der  $\text{NeuS}_{Cje}$  wieder. Auch das für die Stabilisierung und richtige Ausrichtung der *N*-Acetylgruppe des ManNAc **2** in der *active-site* essentielle Arg314 aus der gegenüberliegenden AFPIII-ähnlichen Domäne der zweiten monomeren Untereinheit ist in der simulierten Struktur von  $\text{NeuS}_{Cje}$  vorhanden. Abbildung 3.45 [b] zeigt die überlagerten Strukturen der beiden *N*-Acetylneuraminsäuresynthase in der *active-site*. Die Positionen der Aminosäuren in beiden Enzymen sind identisch, nur die Ausrichtung unterscheidet sich in den beiden Taschen in geringem Maße voneinander. Die leicht verschiedene Orientierung in der simulierten Struktur von  $\text{NeuS}_{Cje}$  zwischen den Substraten und den einzelnen Aminosäuren führen aber trotzdem zur selben Ausrichtung und Stabilisierung wie bei der  $\text{NeuS}_{Nme}$ .



In Abbildung 3.46 ist die *active-site* von NeuS<sub>Cje</sub> nochmals gezeigt mit dem für die Aktivität der Synthese essentiellen Arg314 und den Aminosäureresten, welche die Position dieses Arg314 stabilisieren.

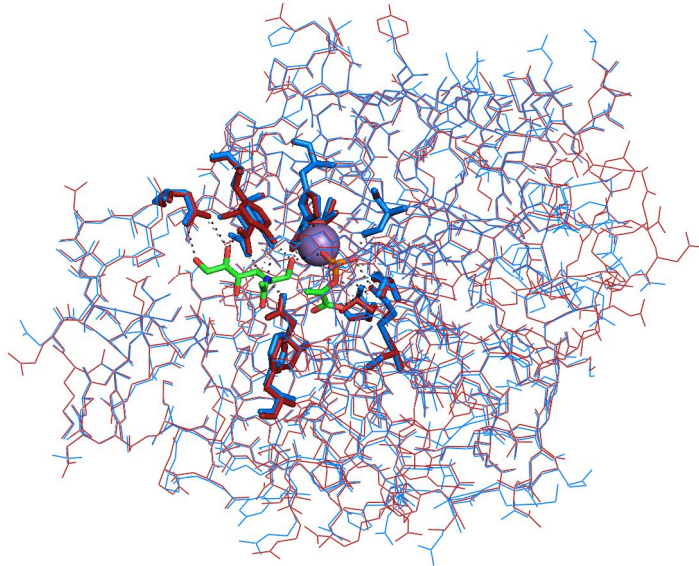


**Abbildung 3.46:** Darstellung aller in der *active-site* von NeuS<sub>Cje</sub> durch polare Wechselwirkungen an der Reaktion beteiligten Aminosäuren, sowie aller Aminosäuren welche die korrekte Lage und Ausrichtung des Arg314 gewährleisten. Die beiden Substrate rManNAc, PEP sowie das Arg314 sind in grün und das zweiwertige Mangan in violet dargestellt.

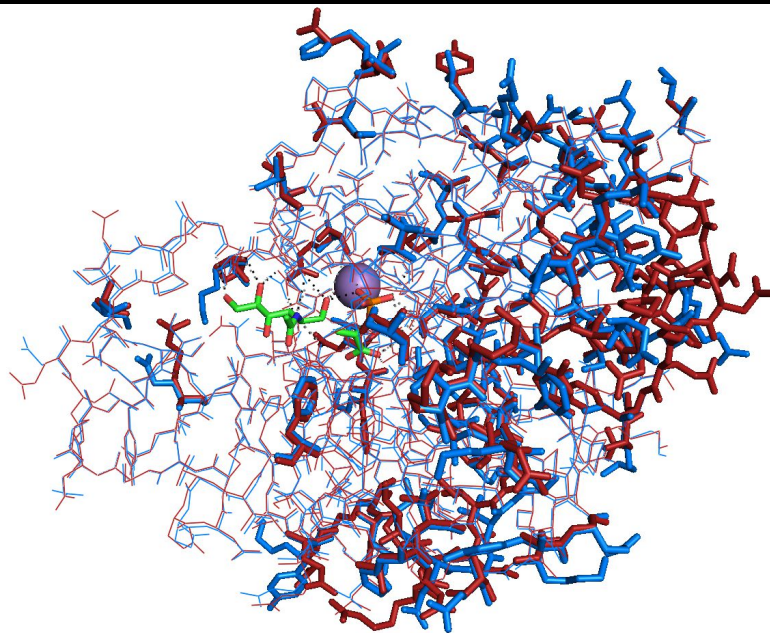
Wie bei der NeuS<sub>Nme</sub> sind auch hier an der Stabilisierung und korrekten Ausrichtung des Arg314 dieselben Aminosäuren beteiligt. Bis auf ein Glycin aus der AFP-III-ähnlichen Domäne, aus der auch das Arg314 stammt, sind alle anderen durch polare Wechselwirkungen an der korrekten Ausrichtung des Arg314 beteiligten Aminosäuren aus der die *active-site* enthaltenden Untereinheit. Die in den kinetischen Studien gewonnenen Daten über die breite Substrattoleranz der NeuS<sub>Cje</sub> werden durch den Vergleich der simulierten Struktur mit der experimentellen Struktur der NeuS<sub>Nme</sub> bestätigt. Die Tendenzen aus der *N*-Modifizierung der Seitenkette und aus konfigurativen Änderungen im Zuckergrundgerüst sind für die beiden *N*-Acetylneuraminsäuresynthasen gleich. NeuS<sub>Cje</sub> ist hierbei meist, bezüglich der Affinität und Aktivität zum jeweiligen Substrat, das weniger tolerante Enzym, wobei die numerischen Werte zwischen einem Faktor zwei bis zu einer Größenordnung schlechter sind als für die NeuS<sub>Nme</sub>. Da die *active-sites* der beiden Synthasen identisch sind, kann der Grund für die schlechteren Werte der NeuS<sub>Cje</sub> nur in der Peripherie um die *active-site* liegen. Um diesen

Sachverhalt zu klären, wurde der Vergleich der beiden Synthasen auf die komplette, die *active-site* enthaltende, Domäne ausgeweitet (Abbildung 3.47).

[a]



[b]



**Abbildung 3.47:** Untersuchung der Peripherie beider *N*-Acetylneuraminsäuresynthasen **NeuS<sub>Nme</sub>** (PDB-Code 1XUZ) und **NeuS<sub>Cje</sub>** (simuliertes Modell) zur Klärung des Unterschiedes der schlechteren Affinitäten und Aktivitäten von **NeuS<sub>Cje</sub>** gegenüber den jeweiligen Substraten. **[a]** Lage der active site in der *N*-terminalen Domäne (beteiligte Aminosäuren als Sticks dargestellt) und **[b]** Vergleich aller Aminosäuren in der Domäne (identische AS als Linien, unterschiedliche AS als Sticks dargestellt)

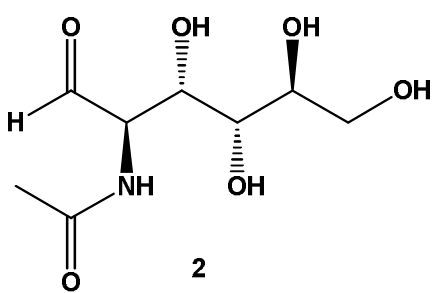
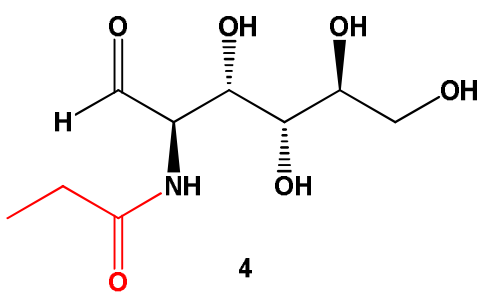
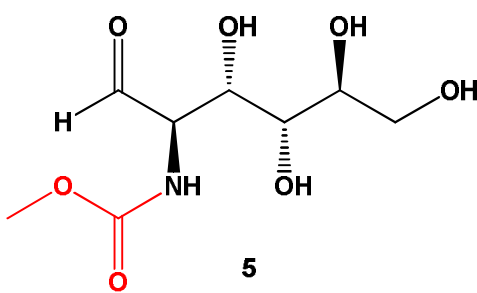
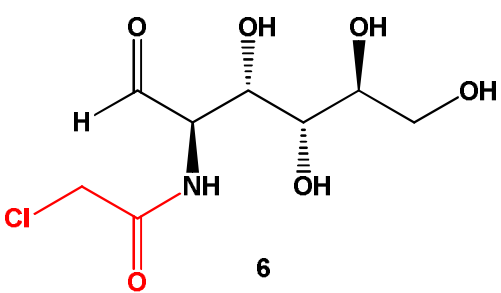
---

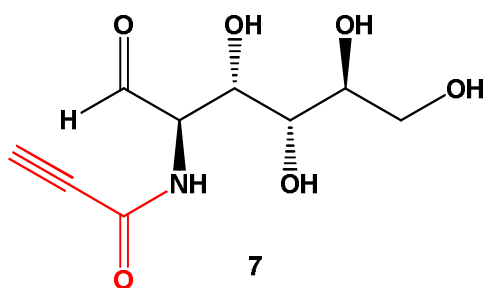
Aus dem Vergleich der *N*-terminalen Domänen Abbildung 3.47 [a] wird deutlich, dass es in der näheren Umgebung der *active-sites* beider Synthasen nur wenige Unterschiede in der Aminosäureabfolge gibt, nur die räumliche Orientierung der Aminosäuren unterscheidet sich graduell, was jedoch der Unsicherheit des simulierten Modells der NeuS<sub>Cje</sub> geschuldet ist. Entfernt man sich räumlich weiter von der *active-site*, werden die Unterschiede jedoch immer signifikanter. Alle sich unterscheidenden Aminosäuren sind in Abbildung 3.47 [b] als Sticks hervorgehoben. Auch wenn sich diese Unterschiede nicht in direkter Nähe zur *active-site* befinden, können sie einen Einfluß auf diese und somit auf die katalysierte Reaktion haben. Dies bietet eine mögliche Erklärung für die schlechtere Affinität und Aktivität der NeuS<sub>Cje</sub> gegenüber den im Assay vermessenen Substraten. Um eine fundierte klärende Antwort auf diese Frage der schlechteren Affinitäten und Aktivitäten zu erhalten, wäre es notwendig auch von der NeuS<sub>Cje</sub> eine Kristallstruktur zu bekommen um die beiden experimentellen Strukturen miteinander zu vergleichen. Durch die Simulation der Struktur von NeuS<sub>Cje</sub> ist ein gewisser Interpretationsrahmen gegeben, allerdings wird diese eventuell von der experimentellen Struktur der Synthase Abweichungen haben, die aus dem simulierten Modell nicht erkennbar waren.

Die Ergebnisse aus dem kontinuierlichen gekoppelten Enzymassay für die beiden *N*-Acetylneuraminsäuresynthasen NeuS<sub>Nme</sub> und NeuS<sub>Cje</sub> werden nicht nur durch die Untersuchung der Strukturen untermauert, auch eine Reihe von präparativen Synthesen mit NeuS<sub>Nme</sub> und im Assay eingesetzten Substraten bestätigen die breite Substrattoleranz (Tabelle 3.26).



**Tabelle 3.26:** Überblick über die in präparativen Synthesen mit der NeuS<sub>Nme</sub> eingesetzten Substrate. Für einen besseren Vergleich sind neben den Ausbeuten auch die hier bestimmten  $K_M$ - und  $k_{cat}$ -Werte der jeweiligen Substrate angegeben. Elektronische und konfigurative Änderungen in den Substraten gegenüber dem natürlichen Substrat ManNAc **2** sind **rot** hervorgehoben.

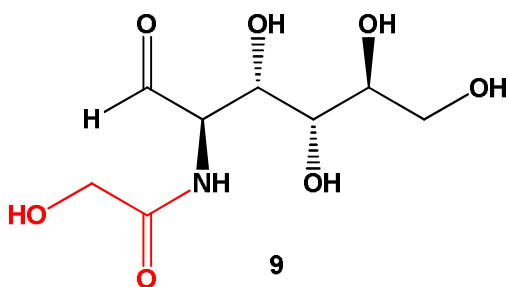
Edukt	$K_M$ -Wert	Ausbeute (%)
	[mM] $k_{cat}$ -Wert [s <sup>-1</sup> ]	
 <p style="text-align: center;"><b>2</b></p>	<p>0,5</p> <p><math>7,5 \cdot 10^{-1}</math></p>	quantitativ
 <p style="text-align: center;"><b>4</b></p>	<p>1,9</p> <p><math>6,9 \cdot 10^{-1}</math></p>	70 <sup>[a]</sup>
 <p style="text-align: center;"><b>5</b></p>	<p>17,85</p> <p><math>4,7 \cdot 10^{-1}</math></p>	12
 <p style="text-align: center;"><b>6</b></p>	<p>0,25</p> <p><math>4,7 \cdot 10^{-1}</math></p>	14



3,20

+/-

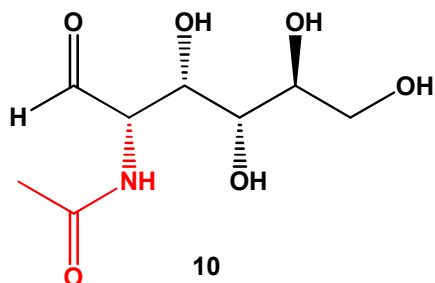
$1,5 \cdot 10^{-1}$



2,50

10

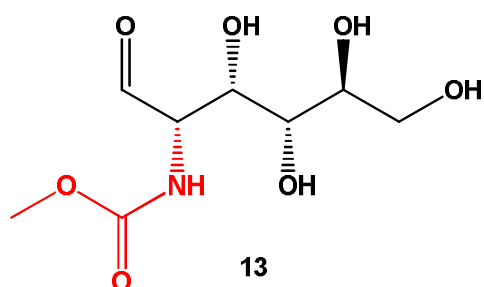
$2,7 \cdot 10^{-2}$



182,87

9

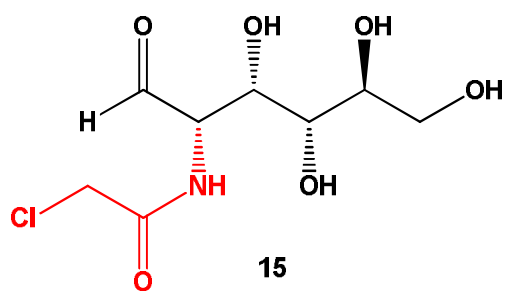
$6,1 \cdot 10^{-3}$



262,84

4

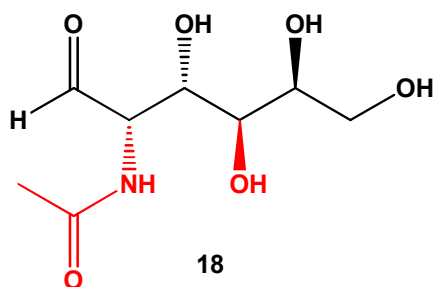
$4,5 \cdot 10^{-1}$



113,66

+/-

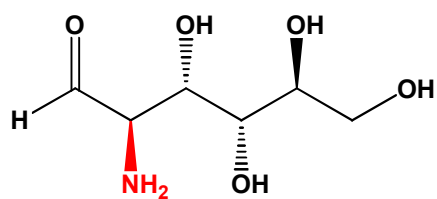
$2,7 \cdot 10^{-1}$



63,10

+/-

$7,9 \cdot 10^{-4}$

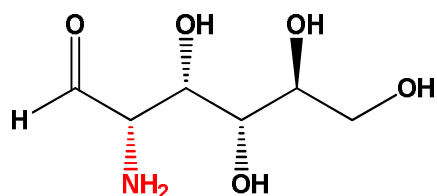


33

101,71

+/- [a]

$3,2 \cdot 10^{-3}$

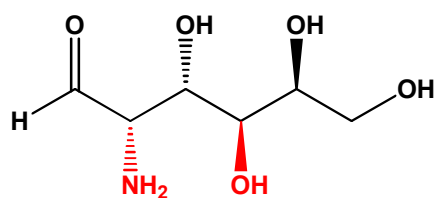


34

122,07

+/- [a]

$2,0 \cdot 10^{-4}$

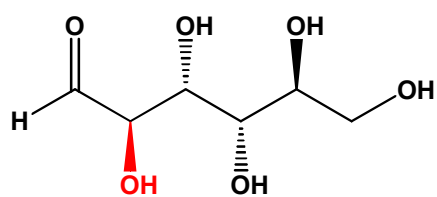


35

184,53

+/- [a]

$4,4 \cdot 10^{-4}$

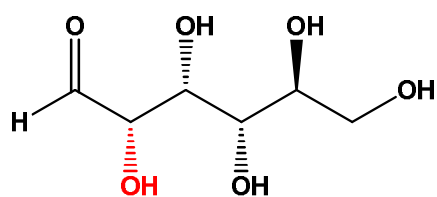


36

53,13

62<sup>[a]</sup>

$6,0 \cdot 10^{-3}$

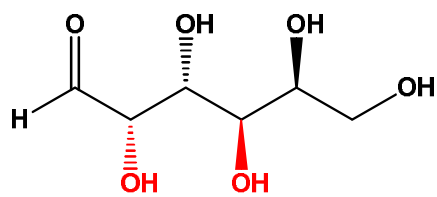


37

250,66

+ [a]

$3,2 \cdot 10^{-3}$

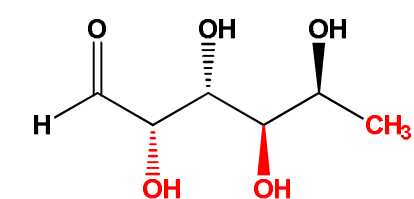


38

277,09

+ [a]

$6,9 \cdot 10^{-3}$

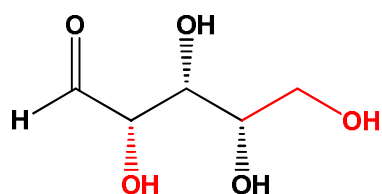


39

47,75

+ [a]

$2,5 \cdot 10^{-2}$

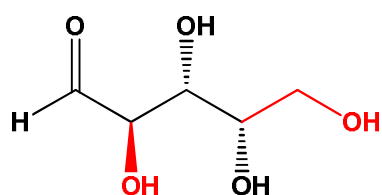


40

395,36

+ [a]

$1,3 \cdot 10^{-3}$

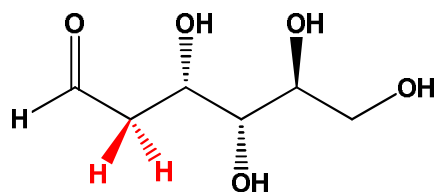


41

129,68

48<sup>[a]</sup>

$3,7 \cdot 10^{-3}$

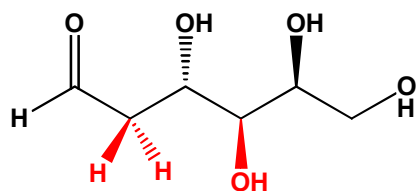


42

287,26

64<sup>[a]</sup>

$9,3 \cdot 10^{-3}$



43

284,03

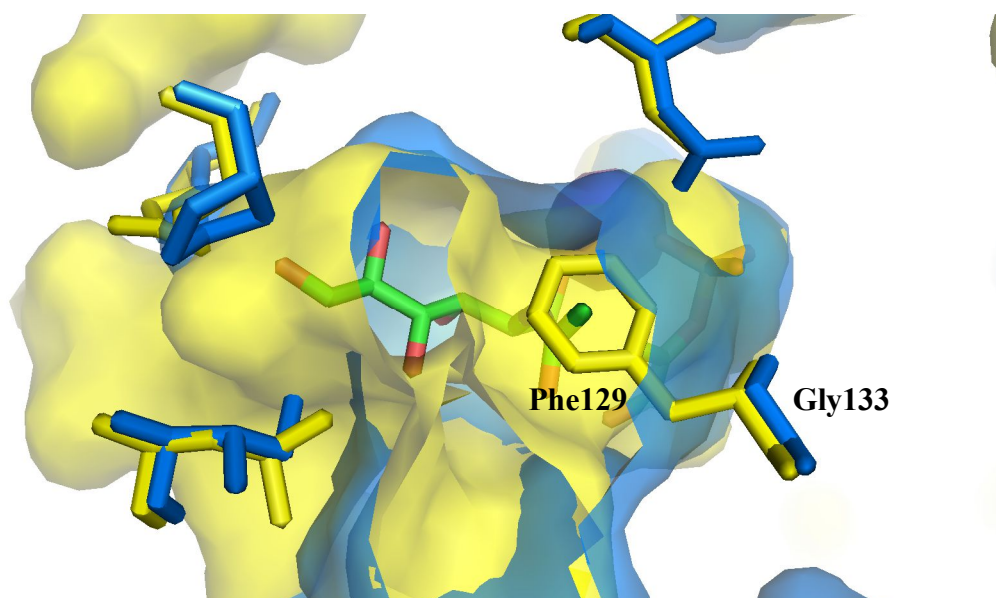
46<sup>[a]</sup>

$5,4 \cdot 10^{-3}$

<sup>[a]</sup> Synthesen wurden in früheren Arbeiten in unserer Gruppe durchgeführt; Synthesen mit „+ und +/-“, wurden nicht präparativ durchgeführt, Produktdetektion via TLC; + = guter Umsatz nach 1h; +/- = mäßiger Umsatz nach 1h.

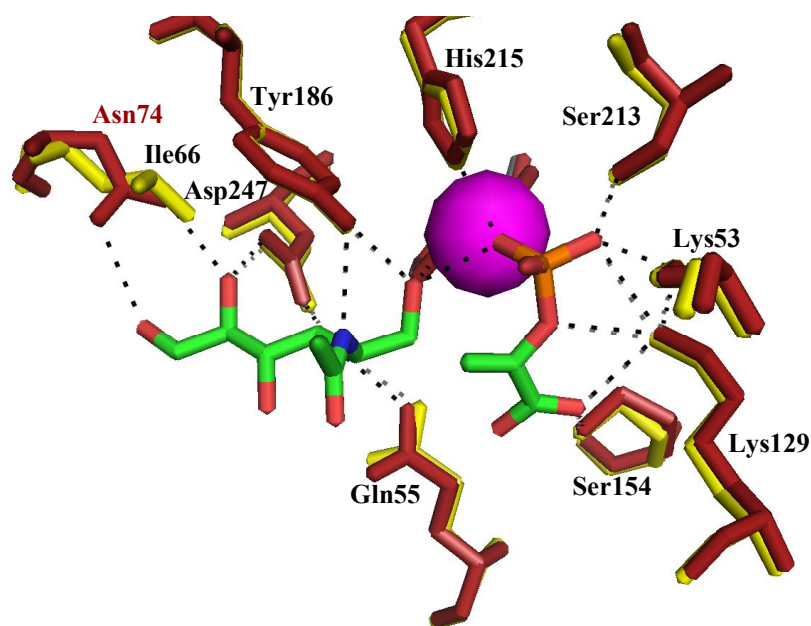
Zwischen den Ergebnissen aus den kinetischen Studien und den präparativen Synthesen erkennt man in Tabelle 3.26 stellenweise eine gewisse Diskrepanz. Trotz großer konfigurativer Änderungen konnten in früheren Arbeiten in präparativen Synthesen mit den beiden Deoxyzuckern 2-Deoxy-D-glucose **42** und 2-Deoxy-D-galactose **43**, sowie mit D-Lyxose **41** gute Ausbeuten erreicht werden<sup>[69-70]</sup>, die annähernd der Ausbeute in der präparativen Synthese mit dem Substrat *N*-Pentanoylmannosamin **4** entspricht. Diese Ergebnisse gehen mit den kinetischen Daten für die jeweiligen Substrate nicht konform. In den kinetischen Studien zeigt sich, dass bei fortschreitenden konfigurativen Änderungen gegenüber dem natürlichen Substrat ManNAc **2** die Affinität und auch die Aktivität der NeuS<sub>Nme</sub> wie erwartet diesen Substraten gegenüber stark abnehmen. Eine Erklärung für die überraschend guten Ausbeuten ist, dass die präparativen Synthesen nicht unter direkt vergleichbaren Bedingungen durchgeführt wurden.

Für den Vergleich der Pseudaminsäuresynthase PseS<sub>Cje</sub> mit der *N*-Acetylneuraminsäuresynthase NeuS<sub>Cje</sub> wurde auch ein simuliertes Strukturmodell der PseS<sub>Cje</sub> verwendet. Das Faltungsmuster der Pseudaminsäuresynthase entspricht dem bekannten Muster der NeuS<sub>Nme</sub>, am C-terminalen Ende lokalisiert ist ein (α/β)<sub>8</sub>-Fass, welches über eine kurze Linkerregion mit der AFP-III-ähnlichen Domäne verbunden ist. Von beiden Enzymen wurden die *active-sites* näher miteinander verglichen. (Abbildung 3.48).



**Abbildung 3.48:** Vergleich der Taschen mit den active sites der beiden PEP-abhängigen Synthasen NeuS<sub>Cje</sub> und PseS<sub>Cje</sub>. Beide Modelle sind simuliert, da die simulierte Struktur von NeuS<sub>Cje</sub> in der *active-site* identisch mit der bestätigten Struktur von NeuS<sub>Nme</sub> ist, wurde diese zum Vergleich verwendet. Die beiden Substrate rManNAc und PEP sind in grün und das zweiwertige Mangan in violett dargestellt.

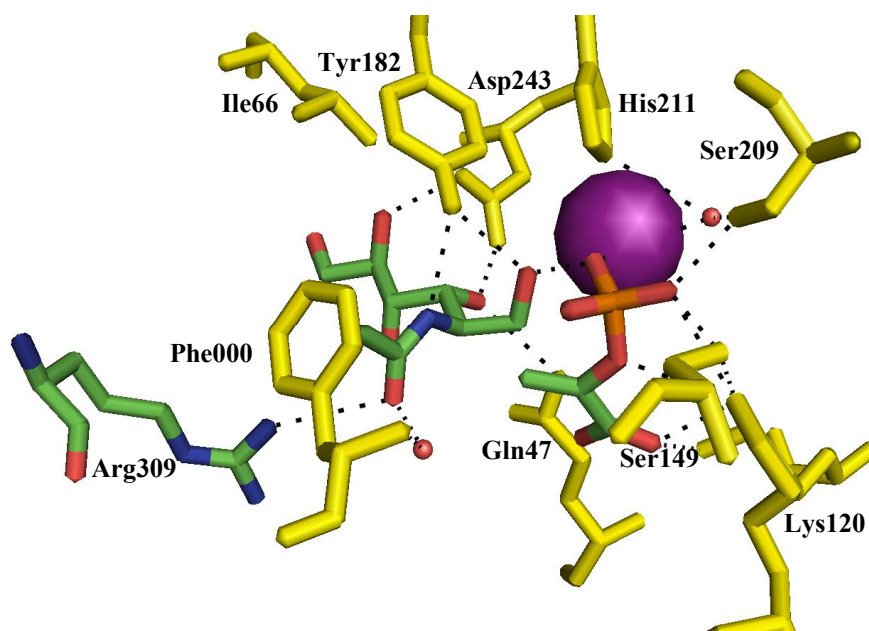
Der Vergleich der C-terminalen Domänen der Pseudaminsäuresynthase **PseS<sub>Cje</sub>** mit der der *N*-Acetylneuraminsäuresynthase **NeuS<sub>Cje</sub>** zeigt, dass sich in beiden Enzymen die Tasche mit der *active-site* an der gleichen Position befindet. Die Tasche der **PseS<sub>Cje</sub>** ist ebenfalls räumlich sehr groß und bietet viel Platz für die Substrate. Sie unterscheidet sich jedoch in einem Punkt drastisch von der Tasche der **NeuS<sub>Cje</sub>**. Der Eingang zur *active-site* ist wegen der Anwesenheit eines konformationell nicht flexiblen Phenylalanins anstelle eines Glycinrestes, welcher bei der **NeuS<sub>Cje</sub>** an gleicher Stelle lokalisiert ist, stark verschmälert. Die Lage und Anwesenheit dieses Phenylalaninrestes verengt nicht nur den Eingang zur *active-site*, sondern zeigt auch, warum *manno*-konfigurierte Substrate von der **PseS<sub>Cje</sub>** nicht akzeptiert werden können. Zwischen der *N*-Acetylgruppe und der aromatischen Seitenkette des Phenylalanins ist mit 1,5 Å zu wenig Abstand und es kommt zu sterisch sehr ungünstigen Wechselwirkungen. Die Tasche bietet aber ausreichend Platz für Substrate in der *gluco*- oder *galacto*-Konfiguration.



**Abbildung 3.49** Für den Vergleich der *active-site* und den an der Reaktion durch polare Wechselwirkungen beteiligten Aminosäuren wurde wieder die experimentelle Struktur von **NeuS<sub>Nme</sub>** (PDB-Code 1XUZ) verwendet und mit dem simulierten Modell der **PseS<sub>Cje</sub>** überlagert. Die beiden Substrate rManNAc und PEP sind in grün und das zweiwertige Mangan in violett dargestellt.

Um die *active-site* der **PseS<sub>Cje</sub>** mit der von **NeuS<sub>Nme</sub>** zu vergleichen, wurden die Strukturen der beiden Enzyme überlagert. Als Modellsubstrate fanden das rManNAc und PEP Verwendung,

die in der experimentellen Struktur der NeuS<sub>Nme</sub> mit kristallisiert wurden (Abbildung 3.49). Die Substrate und das zweiwertige Metallion, welches essentiell für die Katalyse ist, passen gut in die simulierte Tasche der PseS<sub>Cje</sub>. Die in der Struktur von NeuS<sub>Nme</sub> identifizierten Aminosäuren, welche durch polare Wechselwirkungen an der katalytischen Reaktion beteiligt sind finden sich auch in der *active-site* der PseS<sub>Cje</sub>. Die Aminosäuren sind bis auf eine Ausnahme in beiden Enzymen identisch. Das natürliche Substrat PEP 1 in der PseS<sub>Cje</sub> wird ebenfalls durch polare Wechselwirkungen so positioniert, dass die vinyischen C-Atome in räumlicher Nähe zur C1-Carbonylfunktionalität des offenkettigen Zuckers lokalisiert sind. Nur bei der Stabilisierung des Zuckers in der Tasche gibt es einen Unterschied zur NeuS<sub>Nme</sub>, da anstelle eines Asparaginrestes, welcher durch polare Wechselwirkungen die C5- und C6-Hydroxygruppen des rManNAc in NeuS<sub>Nme</sub> stabilisiert, hier ein Isoleucinrest lokalisiert ist. Dieser kann durch seine unpolare Seitenkette nicht stabilisierend auf C5- und C6-Hydroxygruppen einwirken. Dies ist im Blick auf das natürliche Substrat 2,4-Diacetamido-2,4,6-tridesoxy-L-altrose (6-deoxy-AltdiNAc) 51 an der C6-Position auch nicht notwendig, da diese dort desoxygeniert ist. Abbildung 3.50 zeigt nochmal alle an der katalytischen Reaktion beteiligten Aminosäuren sowohl aus der *active-site*, als auch das Arg309 aus der zweiten Untereinheit.



**Abbildung 3.50:** Überblick über alle durch polare Wechselwirkungen an der katalysierten Reaktion beteiligten Aminosäuren inklusive dem Arg309 aus der AFP-III-ähnlichen Domäne der zweiten Untereinheit. Die beiden Substrate rManNAc, PEP sowie das Arg309 sind in grün und das zweiwertige Mangan in violett dargestellt.

In der AFP-III-ähnlichen Domäne der **PseS<sub>Cje</sub>** sind im Gegensatz zur **NeuS<sub>Nme</sub>** zwei Argininreste lokalisiert, Arg282 und Arg309, welche durch ihre Lage in die *active-site* reichen und dort durch polare Wechselwirkungen den Carbonylsauerstoff der *N*-Acetylgruppe stabilisieren können (Abbildung 3.50 mit Arg309). Da in beiden Enzymen die Substrate und das zweiwertige Metallion an die gleiche Stelle in der Tasche positioniert werden, dort von denselben Aminosäuren durch polare Wechselwirkungen stabilisiert und ausgerichtet werden, wird der wahre Reaktionsverlauf der durch die **PseS<sub>Cje</sub>** katalysierte Reaktion mit dem der von den beiden *N*-Acetylneuraminsäuresynthasen **NeuS<sub>Nme</sub>** und **NeuS<sub>Cje</sub>** katalysierten identisch sein. Die Resultate aus der kinetischen Studie der Pseudaminsäuresynthese zeigen, dass diese vermutlich auch eine verbreiterte Substrattoleranz besitzen könnten. Weil das natürliche Substrat 2,4-Diacetamido-2,4,6-tridesoxy-L-altrose (6-deoxy-AltdiNAc) **51** der **PseS<sub>Cje</sub>** nicht verfügbar war wurden für die Studie die entsprechenden, dem Zuckergrundgerüst der Altrose konfiguratativ ähnlichen Galactosamin- und Glucosaminderivate als Substrate verwendet. Die **PseS<sub>Cje</sub>** akzeptiert trotz des Fehlens der zweiten *N*-Acetylgruppe an C4-Position und der zusätzlichen Hydroxylierung an der C6-Position *N*-Acetylgalactosamin **18** und *N*-Acetylglucosamin **10**. Dabei ist *N*-Acetylgalactosamin **18** das aufgrund seiner größeren konfigurativen Ähnlichkeit gegenüber dem natürlichen Substrat **51** um einen Faktor vier vorteilhafter. Gegenüber dem natürlichen Substrat **51** hat die **PseS<sub>Cje</sub>** jedoch eine um drei Größenordnungen schlechtere Affinität zu den Substratanaloga *N*-Acetylgalactosamin **18** und *N*-Acetylglucosamin **10**. Die in der Literatur bekannten Daten<sup>[80]</sup> für die Aktivität und Affinität der **PseS<sub>Cje</sub>** zum zweiten natürlichen Substrat PEP **1** konnten durch die kinetischen Studien im Rahmen dieser Arbeit bestätigt werden. Die Aktivität der Pseudaminsäuresynthese im Bezug auf PEP **1** liegt in der gleichen Größenordnung wie für die beiden *N*-Acetylneuraminsäuresynthasen **NeuS<sub>Nme</sub>** und **NeuS<sub>Cje</sub>**. Die Affinität der **PseS<sub>Cje</sub>** zu den an C2-Position *N*-acetylierten *galacto*-konfigurierten Substraten ist um vier bis fünf Größenordnungen schlechter im Vergleich zum natürlichen Substrat 6-deoxy-AltdiNAc **51**. Die Substrattoleranz der Pseudaminsäuresynthese beschränkt sich jedoch ausschließlich auf die vermessenen *galacto*-konfigurierten an C2-Position *N*-modifizierten Substrate und das *N*-Acetylglucosamin **10**. Gegenüber den vermessenen *N*-modifizierten *gluco*-konfigurierten Substrate oder elektronischen Änderung im Substrat, wird es immer unwahrscheinlicher, dass diese in der *active-site* für die Reaktion korrekt positioniert und stabilisiert werden können. Tabelle 3.27 zeigt in einem Überblick die Ergebnisse der präparativen Synthesen, die mit der Pseudaminsäuresynthese **PseS<sub>Cje</sub>** durchgeführt wurden, im Vergleich zu den für die jeweiligen Substrate im kontinuierlich gekoppelten Assay erhaltenen Affinitäten.





---

sinken, die Ausbeuten in den präparativen Synthesen liegen aber im selben Bereich. Zusätzlich wurde in diesen Überblick noch das natürliche Substrat der Pseudaminsäuresynthase 6-Deoxy-AltdiNAc **51** aufgenommen. Der  $K_M$ -Wert wurde von der Gruppe um *Wakarchuk* et al.<sup>[80]</sup> ohne vorherige Rücksprache mit dem in unserer Gruppe von *Knorst* entwickelten Recycling-Assay<sup>[69]</sup> vermessen. Zwischen der Affinität zum natürlichen Substrat und der Affinitäten der *PseS<sub>Cje</sub>* zu den in dieser Arbeit vermessenen Substrate liegt ein Unterschied von vier bis fünf Größenordnungen. Aufgrund der schon vorliegenden konfigurativen Änderung in der Substratstruktur und dem Fehlen der zweiten Acetamidogruppe an C4-Position ist dies verständlich.

Fasst man die Resultate der Strukturuntersuchungen der beiden *N*-Acetylneuraminsäuresynthasen *NeuS<sub>Nme</sub>* und *NeuS<sub>Cje</sub>* mit den erhaltenen Daten aus den kinetischen Studien zusammen, ergibt sich ein positives Gesamtbild. Beide Synthasen sind in ihrer Substrattoleranz weitaus flexibler als erwartet. Sie tolerieren nicht nur Modifikationen in der *N*-acylierten Seitenkette, sondern auch konfigurative Änderung im Zuckergrundgerüst an der C2- und der C4-Position. Durch gezielte Mutationen in der *active-site* und deren Peripherie lässt sich dieses Spektrum wohl nochmals verbreitern, vorallem hinsichtlich der möglichen Modifikationen der Seitenkette der *N*-acylierten Mannosaminderivate. Durch die Anwesenheit eines Methioninrestes in der Peripherie der *active-site* des Wildtyps, ist die Kettenverlängerung ausgehend vom natürlichen Substrat ManNAc **2** nur um bis zu zwei Methyleneinheiten noch mit annehmbaren kinetischen Daten<sup>[58]</sup> verbunden, danach werden die daraus resultierenden sterischen Einflüsse zu groß. Auch wenn die, im Rahmen dieser Arbeit, in den präparativen Synthesen mit den beiden *N*-Acetylneuraminsäuresynthasen *NeuS<sub>Nme</sub>* und *NeuS<sub>Cje</sub>* erhaltenen Ausbeuten an *N*-Acetylneuraminsäurederivaten nicht zufriedenstellend waren, hat man mit den beiden Synthasen gute Werkzeuge zur Hand für die Synthese interessanter, neuartiger Sialinsäurederivate. Durch Optimierung der Synthesen lassen sich die Ausbeuten an diesen wertvollen Substanzen weiter steigern.

Auch die Pseudaminsäuresynthase *PseS<sub>Cje</sub>* hat sich in den kinetischen Studien ebenfalls als relativ tolerant gegenüber Modifikationen in der Substratstruktur gezeigt. Ein Vergleich zwischen der Substrattoleranz der *PseS<sub>Cje</sub>* und der Substrattoleranz der beiden *N*-Acetylneuraminsäuresynthasen *NeuS<sub>Nme</sub>* und *NeuS<sub>Cje</sub>* ist nur bedingt möglich. Auf Grund der Nichtverfügbarkeit des natürlichen Substrates **51** der *PseS<sub>Cje</sub>* und Derivate dessen, sowie das Vorhandensein nur einer simulierten 3D-Struktur des Proteins, kann keine Aussage über die Flexibilität der *PseS<sub>Cje</sub>* gegenüber Modifikationen in den *N*-acylierten Seitenketten des

---

natürlichen Substrates an der C2- und C4-Position gemacht werden. Jedoch konnte in den kinetischen Studien gezeigt werden, dass die PseS<sub>Cje</sub> bezüglich des Substitutionsmusters (*N*-Acetylgalactosamin **18** und die Derivate **19**, **20**, **22**) und der Konfiguration (*N*-Acetylglucosamin **10**) flexibel ist. Der Vergleich der *active-site* der PseS<sub>Cje</sub> (simuliertes 3D-Modell) mit der experimentellen Struktur der NeuS<sub>Nme</sub> zeigt, dass an der katalytischen Reaktion der PseS<sub>Cje</sub> die gleichen Aminosäurereste durch hydrophobe Wechselwirkungen beteiligt sind und die Reaktion nach demselben Mechanismus, wie in der Literatur beschrieben, abläuft.<sup>[30]</sup> Eventuell ist die Toleranz der PseS<sub>Cje</sub> gegenüber konfigurativen Änderungen im Zuckergrundgerüst noch größer, hin zu *manno*-konfigurierten Substraten. Um diese Frage beantworten zu können ist jedoch zunächst eine gezielte Mutation der PseS<sub>Cje</sub> nötig. Der Wildtyp kann ManNAc **2** oder *manno*-konfigurierte Derivate nicht umsetzen, die *N*-Acetamidogruppe des ManNAc **2** passt aufgrund eines Phenylalaninrestes (an der Stelle eines Glycinrestes in der NeuS<sub>Nme</sub>) nicht in die Tasche der *active-site*. Durch präparative Synthesen mit der PseS<sub>Cje</sub> konnten zusätzlich die neuartigen Sialinsäurederivate **24**, **25** und **26** in geringen Ausbeuten isoliert und charakterisiert werden.

Die genaue Funktion des NeuB2-Proteins ist weiterhin unbekannt, aus den vergleichenden Untersuchungen der Struktur mit den anderen PEP-abhängigen Synthase und den Daten aus dem phylogenetischen Stammbaum, ist dieses Protein sehr wahrscheinlich an der Synthese eines C<sub>7</sub>- bis C<sub>9</sub>-Zuckers beteiligt.

Mit der Etablierung des kontinuierlichen High-Throughput-Assays, auf der Basis des Recycling-Assays von Knorst<sup>[69]</sup>, für die PEP-abhängige Synthasen im Rahmen dieser Arbeit ist es gelungen ein effektives Werkzeug für kinetischen Studien in die Hand zu bekommen. Dieser Assay hat gegenüber den altbekannten in der Literatur beschrieben Assays<sup>[130, 132]</sup> für Sialinsäuren die Vorteile, dass er eine sehr geringe Nachweisgrenzen und Fehleranfälligkeit besitzt, sowie schnell und reproduzierbar viele Daten liefert. Ein weiterer großer Vorteil dieses Assays ist seine Miniaturisierbarkeit, dadurch verringert sich zum Einen der Verbrauch an wertvollen Ausgangssubstanzen (Substrate und Enzyme), zum Anderen können computergestützte Screenings durchgeführt werden.

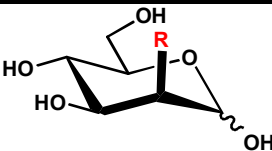
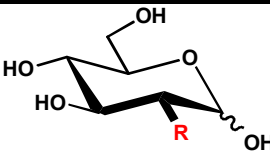
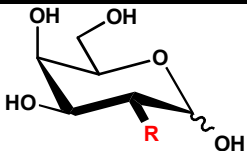
## 4 Zusammenfassung und Ausblick

Das Ziel der Arbeit war die detaillierte Untersuchung der PEP-abhängigen Sialinsäuresynthasen aus den pathogenen Mikroorganismen *Campylobacter jejuni* und *Neisseria meningitidis*. Neben präparativen enzymatischen Synthesen sollte zur Kartierung der Substratbreite ein High-Throughput-Assay für diese Enzyme etabliert werden

### 4.1 Chemische Synthese der Enzymsubstrate

Für die kinetischen Studien der Sialinsäuresynthasen erfolgte die Auswahl an unterschiedlichen Zuckern als potentielle Substrate (Kap. 3, Tab. 3.1.) unter dem Gesichtspunkt, dass die Toleranz der Synthasen gegenüber konfigurativen, elektronischen und sterischen Änderungen in der Substratstruktur untersucht werden konnte. Kommerziell nicht verfügbare D-manno-, gluco- und galacto-konfigurierte Aminozuckerderivate wurden über meist einstufige, standardisierte Routen synthetisiert, mit guten bis befriedigenden Ausbeuten (Tab. 4.1).

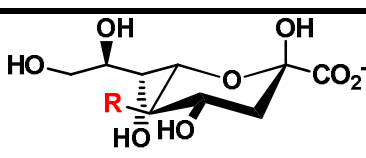
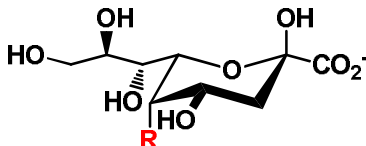
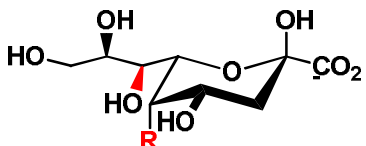
**Tabelle 4.1:** Synthese N-modifizierter Aminozuckerderivate.

			
<b>R</b> = NHCOAc	<b>2</b> / — <sup>[a]</sup>	<b>10</b> / 60%	<b>18</b> / 90%
<b>R</b> = NHCOH	<b>3</b> / 85%	<b>11</b> / 90%	<b>21</b> / 67%
<b>R</b> = NHCOCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	<b>4</b> / 62%	<b>12</b> / 68%	<b>19</b> / 73%
<b>R</b> = NHCO <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	<b>5</b> / 79%	<b>13</b> / 58%	<b>20</b> / 52%
<b>R</b> = NHCOCH <sub>2</sub> Cl	<b>6</b> / 93%	<b>15</b> / 79%	— <sup>[b]</sup>
<b>R</b> = NHCOCCH	<b>7</b> / 91%	<b>16</b> / 85%	<b>22</b> / 68%
<b>R</b> = NHCOCH <sub>2</sub> N <sub>3</sub>	<b>8</b> / 90%	— <sup>[b]</sup>	— <sup>[b]</sup>
<b>R</b> = NHCOCH <sub>2</sub> OH	<b>9</b> / 54%	— <sup>[b]</sup>	— <sup>[b]</sup>

<sup>[a]</sup> kommerziell erworben. <sup>[b]</sup> nicht synthetisiert.

Ausgewählte Aminosuckerderivate wurden für präparative Synthesen mit den Synthasen NeuS<sub>Nme</sub>, NeuS<sub>Cje</sub> und PseS<sub>Cje</sub> eingesetzt. Ein vollständiger Umsatz konnte nur mit den beiden Synthasen NeuS<sub>Nme</sub> und NeuS<sub>Cje</sub> und deren natürlichem Substrat erreicht werden. Die Ausbeuten an den analogen Sialinsäurederivaten sind mit 4-15 % weniger zufriedenstellend (Tab. 4.2). Der Grund für die begrenzten Ausbeuten konnte trotz eingehender Untersuchungen des Reaktionssystems, durch Variation der Äquivalentenverhältnisse der Substrate und der zugegebenen Enzymmenge, sowie portionsweiser Zugabe von Phosphoenolpyruvat **1** nicht aufgeklärt werden. Auch die Möglichkeit einer Produktinhibition der Synthasen wurde untersucht, was sich jedoch nicht bestätigte.

**Tabelle 4.2:** Ergebnisse der Synthesen mit den Synthasen NeuS<sub>Nme</sub>, NeuS<sub>Cje</sub> und PseS<sub>Cje</sub>.

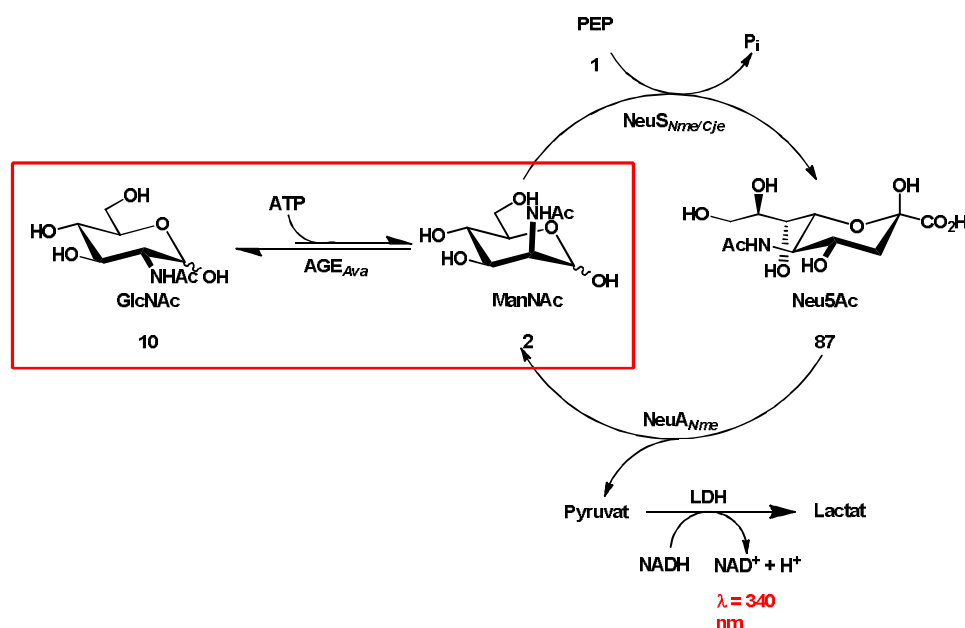
		NeuS <sub>Nme/Cje</sub>	PseS <sub>Cje</sub>
	<b>R</b> = NHCOAc	<b>87</b> / quant.	— <sup>[a]</sup>
	<b>R</b> = NHCO <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	<b>29</b> / 12 %	— <sup>[a]</sup>
	<b>R</b> = NHCOCH <sub>2</sub> Cl	<b>27</b> / 14 %	— <sup>[a]</sup>
	<b>R</b> = NHCOCH <sub>2</sub> OH	<b>30</b> / 11 %.	— <sup>[a]</sup>
	<b>R</b> = NHCOAc	<b>24</b> / 9 %.	<b>24</b> / 12 %.
	<b>R</b> = NHCO <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	<b>26</b> / 4 %.	— <sup>[a]</sup>
	<b>R</b> = NHCOAc	— <sup>[a]</sup>	<b>25</b> / 8 %.
	<b>R</b> = NHCO <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	— <sup>[a]</sup>	<b>94</b> / 7 %.

<sup>[a]</sup> keine präparative Synthese.

Die aus den Synthesen mit der PseS<sub>Cje</sub> erhaltenen Produkte **24** und **25** wurden in einer Kaskadenreaktion zunächst enzymatisch mit der CSS<sub>Nme</sub> aktiviert und mit Hilfe der (α2,6)-SiaT<sub>Plc</sub> auf den Lactosylakzeptor **23** transferiert. Diese enzymatischen Synthesen verliefen ebenfalls nicht zu vollständigem Umsatz, so dass die über RP<sub>18</sub>-Kieselgel aufgereinigten Produkte **31** und **32** nur in Ausbeuten von 10% erhalten wurden (Kap. 3.3).

## 4.2 Etablierung eines kontinuierlichen High-Throughput-Assays für die kinetische Charakterisierung der Synthesen

Die wenigen bisher in der Literatur beschriebenen Assays für kinetische Studien PEP-abhängiger Synthesen wie der Thiobarbitursäure-<sup>[130]</sup> oder der Phosphat-Assay<sup>[132]</sup> sind diskontinuierliche Verfahren. Die Nachteile dieser Methoden sind eine große Fehleranfälligkeit und eine für aussagekräftige kinetische Studien zu niedrige Nachweisgrenze, was eine schnelle und effektive Reproduzierbarkeit der Ergebnisse schwierig macht. Zudem sind diese Assays nicht für eine Miniaturisierung geeignet. Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher ein kontinuierlicher, gekoppelter Enzymassay für diese PEP-abhängigen Synthesen im Mikrotiterplatten-Format etabliert. Die Basis für diesen Assay war der in einer früheren Arbeit von *Knorst*<sup>[69]</sup> zur Konzentrationsbestimmung von Sialinsäuren entwickelte Recycling-Assay (Schema 4.1).



**Schema 4.1:** Gekoppelter, kontinuierlicher Enzym-Assay, bestehend aus dem Recycling-Assay mit vorgeschalteter Epimerisierungsreaktion, katalysiert durch die *N*-Acetylglucosamin-2-epimerase AGE<sub>Ava</sub> (EC 5.1.3.8).

Während der Optimierung der einzelnen Teilschritte wurde deutlich, dass der vorgeschaltete Epimerisierungsschritt für den Assay nicht notwendig ist (Kap. 3.4.2). Die tolerierte Substratbreite der beiden Synthesen NeuS<sub>Nme</sub> und NeuS<sub>Cje</sub> ist weit größer als erwartet. Nach

---

der Bestimmung der kinetischen Konstanten für die natürlichen Substrate **1** und **2** konnten alle für die kinetischen Studien ausgewählten Zucker mit NeuS<sub>Nme</sub> und NeuS<sub>Cje</sub> erfolgreich vermessen werden.

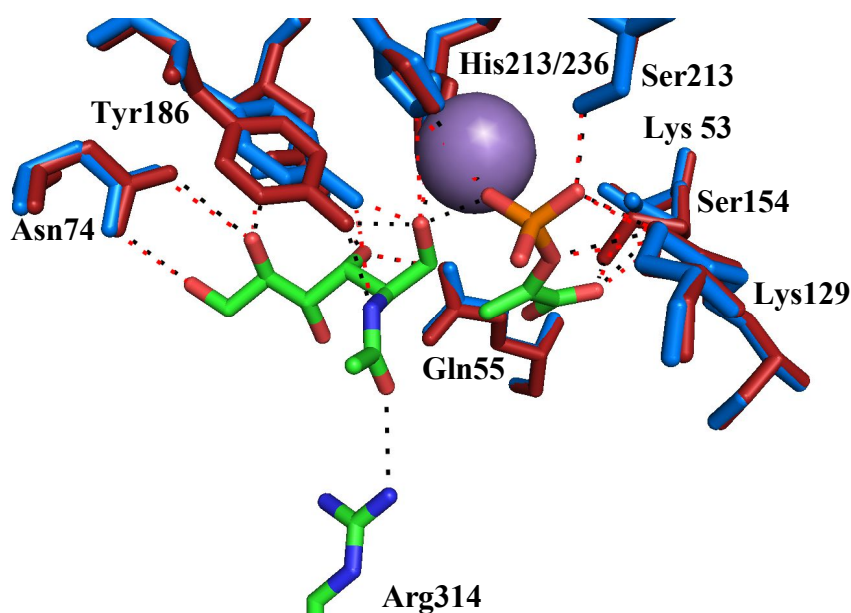
#### 4.2.1 Kinetische Studien mit den Synthasen NeuS<sub>Nme</sub> und NeuS<sub>Cje</sub>

Beide Synthasen zeigen gegenüber den in der Seitenkette *N*-acylierten Mannosaminderivaten **3-9** eine gute katalytische Effizienz, die nur um ein bis zwei Größenordnungen geringer ist als für das natürliche Substrat *N*-Acetylmannosamin **2** (Tab. 3.17). Die beste katalytische Effizienz zeigen beide gegenüber dem *N*-Propanoylmannosamin **4** und dem heterosubstituierten *N*-Chloracetylmannosamin **6**. Eine Verkürzung zum *N*-Formylmannosamin **3** senkt die Effizienz beider Synthasen um eine weitere Größenordnung ab.

Die analogen Glucosamin- (**10-15**) und Galactosaminderivate (**18-22**), mit Ausnahme des *N*-Formylgalactosamins **21**, werden von beiden Synthasen NeuS<sub>Nme</sub> und NeuS<sub>Cje</sub> ebenfalls als Substrate akzeptiert. Im Vergleich zu den Mannosaminderivaten, sind die Affinitäten für Glucosamin- und Galactosaminderivate jedoch bis zu einer Größenordnung schlechter. Die Aktivität sinkt um ein bis vier Größenordnungen ab. Eine Ausnahme bilden für die NeuS<sub>Nme</sub> die Substrate **12** und **14**, für welche die Aktivität im gleichen Größenbereich liegt wie für die entsprechenden Mannosaminderivate **4** und **6**. Auch die katalytische Effizienz von NeuS<sub>Nme</sub> und NeuS<sub>Cje</sub> ist um zwei bis drei Größenordnungen geringer als für Mannosaminderivate **3-9**.

Die Vermessung der Zucker **33-44** (Abb. 3.31; Tab. 3.23) zeigte, dass beide Synthasen NeuS<sub>Nme</sub> und NeuS<sub>Cje</sub> offenbar auch Verlängerungen tolerieren, die über die Modifikation der Seitenkette an C2-Position und konfigurativen Änderungen an C2-/C4-Position hinausgehen. Die im natürlichen Substrat **2** vorhandene Amideinheit ist nicht essentiell für die Aktivität der Synthasen. Eine freie Aminogruppe an C2-Position (**33-35**) wird ebenso akzeptiert wie eine Hydroxygruppe (**36-38**). Die Affinität zu den Aminozuckern **33-35** und den normalen Zuckern **36-38** liegt im selben Größenbereich, wie bei den entsprechenden *N*-modifizierten Glucosamin- (**10-15**) und Galactosaminderivaten (**18-22**). Ein Ersatz der Amidgruppe macht sich vor allem in der Aktivität und Effizienz gegenüber den Substraten **33-38** bemerkbar. Diese sind nochmals um ein bis zwei Größenordnungen niedriger im Vergleich zu den Substraten **10-15** und **18-22**, bzw. drei bis vier Größenordnungen gegenüber den Mannosaminderivaten **3-9**. Vergleichbare Resultate lieferte die Vermessung von D-Fucose **39**,

D-Xylose **40**, D-Lyxose **41** sowie der beiden Deoxyzucker **42** und **43**. Eine Änderung der Konfiguration an der C3-Position, wie sie in der 2-Deoxy-D-Ribose **44** vorliegt, führt jedoch zu einem kompletten Aktivitätsverlust. Die Konfiguration der 3-Hydroxygruppe ist offenbar für die Aktivität der *N*-Acetylneuraminsäuresynthasen essentiell. Ein struktureller Vergleich der *active-sites* der NeuS<sub>Nme</sub> und der NeuS<sub>Cje</sub> zeigte, dass diese nahezu identisch sind. Die Größe der Tasche ist ähnlich und die Lage der Substrate und des Mn<sup>2+</sup>-Ions sind identisch. Alle an der Reaktion in der NeuS<sub>Nme</sub> durch polare Wechselwirkungen beteiligten Aminosäurereste finden sich in der simulierten Struktur der NeuS<sub>Cje</sub> wieder (Abb. 4.1).



**Abbildung 4.1:** Überlagerte Darstellung der an der katalytischen Reaktion von NeuS<sub>Nme</sub> und NeuS<sub>Cje</sub> durch polare Wechselwirkungen beteiligten Aminosäurereste.

Die beiden *N*-Acetylneuraminsäuresynthasen NeuS<sub>Nme</sub> und NeuS<sub>Cje</sub> besitzen vergleichbare Substrattoleranz, jedoch gibt es Unterschiede in den Affinitäten, der Aktivität und der katalytischen Effizienz, wobei die NeuS<sub>Nme</sub> in den meisten Fällen besser abschneidet.

#### 4.2.2 Kinetische Studien mit der Pseudaminsäuresynthase PseS<sub>Cje</sub>

Die Substrattoleranz der Pseudaminsäuresynthase PseS<sub>Cje</sub> wurde ebenfalls mit dem kontinuierlich gekoppelten Assay untersucht. Aus Mangel an dem natürlichen Substrat **51** beschränkte sich die Auswahl an Zuckern für die Substratpalette auf (Amino)zuckerderivate in *gluco*- (**10-15**) und *galacto*-Konfiguration (**18-22**, **35** und **38**). Die PseS<sub>Cje</sub> besitzt auch eine gewisse Toleranz gegenüber Substraten mit konfigurativen Änderungen im Grundgerüst (**10**)



---

und an der C2-Position (**18-22**). Mit Ausnahme von *N*-Formylgalactosamin **19** konnten alle Substrate **18-22** erfolgreich vermessen werden (Tab. 3.24).

Die  $\text{PseS}_{Cje}$  zeigt keine Aktivität mit den Substraten **10-15**, **35** und **38** wohl, weil die strukturellen und elektronischen Unterschiede zum natürlichen Substrat **51** zu groß sind. Um die Ergebnisse der kinetischen Studie weiter zu stützen, wurden einige präparative Synthesen durchgeführt (Tab. 3.5) und eine simulierte Struktur der Pseudaminsäuresynthase detailliert untersucht. Im Vergleich der *active-sites* beider Synthasen  $\text{NeuS}_{Nme}$  und  $\text{PseS}_{Cje}$  zeigt sich, dass beide weitgehend übereinstimmen. Fast alle durch polare Wechselwirkungen an der katalytischen Reaktion beteiligten Aminosäuren<sup>[56]</sup> finden sich auch in der simulierten Struktur von  $\text{PseS}_{Cje}$  an denselben Orten lokalisiert wieder. Signifikante Unterschiede finden sich bei der Stabilisierung des Zuckers an C5- und C6-Position. In der  $\text{NeuS}_{Nme}$  werden diese Positionen durch polare Wechselwirkungen mit einem Asparaginrest stabilisiert, während sich bei der  $\text{PseS}_{Cje}$  an dieser Position ein Isoleucinrest befindet (Kap. 3.4.10 Abb. 3.49). Die mechanistischen Details beim Ablauf der katalytischen Reaktion sind für die beiden PEP-abhängigen Sialinsäuresynthasen  $\text{NeuS}_{Nme}$  und  $\text{PseS}_{Cje}$  offenbar sehr ähnlich.

#### **4.2.3 Vergleich der Strukturen der $\text{NeuS}_{Nme}$ , $\text{NeuS}_{Cje}$ , $\text{PseS}_{Cje}$ und des NeuB2-Proteins mit anderen PEP-abhängigen Synthasen**

Zur Familie der PEP-abhängigen Synthase gehören neben der  $\text{NeuS}_{Nme}$ , der  $\text{NeuS}_{Cje}$ , der  $\text{PseS}_{Cje}$  und dem NeuB2-Protein noch weitere Enzyme, wie die KDO8PS (EC 2.5.1.55)<sup>[136]</sup> und die DAH7PS (EC 2.5.1.54).<sup>[65]</sup> Diese Strukturen wurden ebenfalls zum Vergleich herangezogen, da die von der KDO8PS bzw. DAH7PS katalysierten Reaktionen wie die von  $\text{NeuS}_{Nme}$  katalysierte Reaktion stereospezifisch verlaufen. Der Vergleich der Strukturen der  $\text{NeuS}_{Nme}$ , der KDO8PS und der DAH7PS zeigt, dass diese Synthasen in der  $(\alpha/\beta)_8$ -Fass-Domäne mit den *active-sites* nahezu gleich aufgebaut sind (Kap. 3.4.10, Abb. 3.39 und 3.40). Die simulierte Struktur des in den präparativen Synthesen inaktiven NeuB2-Proteins zeigt jedoch nur eine sehr geringe Ähnlichkeit mit der KDO8PS und der DAH7PS (Kap. 3.4.10, Abb. 3.41). Um eine genauere Aussage über die mögliche Art und Funktionsweise des NeuB2-Proteins treffen zu können, wurde ein phylogenetischer Stammbaum der PEP-abhängigen Synthasen erstellt (Kap. 3.4.10, Abb. 3.43). Alle Synthasen haben einen gemeinsamen evolutionären Vorfahren. Aus diesem haben sich  $\text{NeuS}_{Nme}$  und  $\text{NeuS}_{Cje}$  divergent entwickelt, relativ zeitnah entwickelte sich dazu die  $\text{PseS}_{Cje}$  aus diesem Vorläufer,

---

was die Ähnlichkeiten der Synthesen bezüglich der Tertiärstruktur und der katalysierten Reaktion erklärt. Erst später entwickelten sich KDO8PS und DAH7PS aus einem gemeinsamen Vorläufer, sowie parallel dazu das NeuB2-Protein. Die Ergebnisse aus dem phylogenetischen Stammbaum untermauern die erhaltenen Ergebnisse aus dem kinetischen Assay und den jeweiligen Strukturvergleichen. NeuB2 gehört zur Familie der PEP-abhängigen Sialinsäuresynthasen, aus der simulierten Struktur lässt sich jedoch keine fundierte Aussage über die genaue Funktion des NeuB2-Proteins treffen. Die Synthase könnte auch im Laufe der Evolution ihre eigentliche Funktion verloren haben.

Fasst man alle Resultate und Ergebnisse aus den kinetischen Studien und den strukturellen Untersuchungen zusammen, so stellen diese PEP-abhängigen Synthesen NeuS<sub>Nme</sub>, NeuS<sub>Cje</sub> und PseS<sub>Cje</sub> sehr interessante Werkzeuge für die enzymatische Synthese neuartiger Sialinsäureanaloga dar. Diese können darauf aufbauend die Grundbausteine für interessante neuartige Sialokonjugate sein, je nach Substratbreite der beteiligten Enzyme. Mit dem im Rahmen dieser Arbeit etablierten kontinuierlichen Assay, steht eine effektive Methode zur Verfügung, um schnell und reproduzierbar Daten über die Qualität von potentiellen Substraten für die präparative enzymatische Synthese weiterer Sialinsäureanaloga mit den Synthesen zu sammeln.

---

## 5 Experimenteller Teil

---

### 5.1 Allgemeine Bemerkungen

#### NMR-Spektroskopie

$^1\text{H}$ -NMR: 300 MHz Bruker DRX 300  
500 MHz Bruker DRX 500  
 $^{13}\text{C}$ -NMR: 75.4 MHz Bruker DRX 300  
125.8 MHz Bruker DRX 500

Die Angabe der chemischen Verschiebungen sind relativ zum internen Standard Tetramethylsilan (TMS  $\delta = 0$  ppm) in ppm, alle Kopplungskonstanten in Hz angegeben. Alle Messungen erfolgten bei einer Temperatur von 300 K. Die bei der Zuordnung verwendeten Abkürzungen stehen für s = singulett; d = dublett; t = triplett; q = quartett und m allgemein für multipllett. Die  $^{13}\text{C}$ -Spektren sind  $^1\text{H}$ -breitbandentkoppelt. Die Zuordnung der Signale erfolgte mit Hilfe von Literaturangaben, Vergleichswerten sowie DEPT- oder  $^1\text{H}/^1\text{H}$ -(COSY) bzw.  $^1\text{H}/^{13}\text{C}$  (HSQC/HMBC)-korrelierten Spektren.

#### Massenspektroskopie

Elektronensprayionisation (ESI): Bruker-Franzen Esquire LC Massenspektrometer

---

## Chromatographie

### Dünnschichtchromatographie

Kontrolle des Reaktionsverlaufs und der Reinheit der Produkte:

Kieselgelfolien auf Aluminium 60 F<sub>254</sub>, *Merck KGaA*, Darmstadt

Zur Identifizierung von Substanzspots auf den DC-Platten wurden folgende Methoden verwendet:

UV-Absorption bei 254 nm

Fluoreszenz-Anregung bei 366 nm

Anisaldehyd-Reagenz

(200 ml EtOH; 5.5 ml Anisaldehyd; 7.5 ml konz. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 2.2 ml Eisessig)

### Säulenchromatographie

Kieselgel 60, Korngröße 40-63 µm, *Fa. Merck*

Kieselgel 60, Korngröße 63-200 µm, *Fa. Merck*

Kieselgel 100 C-18 reversed phase, Korngröße 40-63 µm, fully uncapped, *Fluka*

Bio Gel P 2 fine, Korngröße 65 ± 20 µm, *BioRad*

Dowex 50 WX8 pract. (H<sup>+</sup>-Form, 100-200 mesh), *Serva*

Dowex 50 WX8 pract. (Cl<sup>-</sup>-Form, 100-200 mesh), *Serva*

### Proteinchromatographie

Säulen: SuperFlo ®50, *Fa. Sephagen*

Füllmaterial: Sepharose CL-6-B, *Pharmacia*

---

## **Gefriertrocknung**

Lyophile: Lyovac GT-2, *Steris*

## **Fermenter**

Biostat<sup>®</sup>B, *Fa. B. Bralin*

## **Zentrifugen**

Biofuge 28 RS, *Heraeus Sepatech*

Centrifuge 5415 R, *Eppendorf*

## **MilliQ-Anlage**

MilliQ UF Plus, *Millipore*

## **Ultrafiltration**

Amicon 8400, Membran: YM 10 (MWCO: 10 kDa), *Amicon*

## **pH-Meter**

Minitrode, *Hamilton*

pH-Elektrode, *VWR*

## **Photometer**

UV-1800 (UV Spectrophotometer), *Shimadzu*

V-560 (UV/VIS Spectrophotometer), *Jasco*

---

## Verwendete Enzyme

- EC 2.4.99.1  $\alpha$ (2,6)-Sialyltransferase aus *Photobacterium leiognathi* JT-SHIZ-145
- EC 2.5.1.56 *N*-Acetylneuraminsäure-Synthase aus *Neisseria meningitidis* serogroup B (NeuS<sub>Nme</sub>)
- EC 2.5.1.57 *N*-Acetylneuraminsäure-Synthase aus *Campylobacter jejuni* (NeuS<sub>Cje</sub>)
- EC 2.5.1.97 Pseudaminsäuresynthase aus *Campylobacter jejuni* (PseS<sub>Cje</sub>)
- EC 2.7.7.43 CMP-Sialat-Synthetase aus *Neisseria meningitidis* serogroup B (CSS)
- EC 3.1.3.1 alkalische Phosphatase aus *Rinderdarmschleimhaut* 1649 U/mg, CIAP, *Fluka*
- EC 3.6.1.1 anorganische Pyrophosphatase aus *Bäckerhefe* 1280 U/mg, Ppase, *Sigma*
- EC 4.1.3.3 Neuraminsäure-Aldolase 22.1 U/mg, NeuA, *Sorachim*
- EC 5.1.3.8 *N*-Acetylglucosamin-2-Epimerase aus *Anabaena variabilis* ATCC 29413 (AGE<sub>Ava</sub>), Prof. Dr. Castiglione, TU München

## Biologische Reagentien

### Lysogeny Broth Medium (LB Medium)

Tryptone	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	10 g
ad. H <sub>2</sub> O	1 L

\* pH-Wert 7.2, autoklavieren

### Low Salt Lysogeny Broth Medium (LB Medium)

Tryptone	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	5 g
ad. H <sub>2</sub> O	1 L

---

\* pH-Wert 7.2, autoklavieren

### **Terrific Broth Medium (TB Medium)**

Tryptone	12 g
Hefeextrakt	24 g
Glycerol	4 ml
ad. H <sub>2</sub> O	900 ml

\* autoklavieren, auf ~ 60°C abkühlen lassen, Zugabe von steril-filtriertem 10 X TB-Phosphat (0.17 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.72 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>).

### **Super Optimal Broth Medium (SOB-Medium)**

Tryptone	20 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	0.5 g
0.25 M KCl	10 ml
ad. H <sub>2</sub> O	990 ml

\* pH-Wert auf 7.0 einstellen, autoklavieren, auf Raumtemperatur abkühlen lassen, Zugabe von 10 ml einer sterilen 1 M MgCl<sub>2</sub>-Lösung

### **Super Optimal Broth with Catabolite Repression Medium (SOC-Medium)**

Tryptone	20 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	0.5 g
0.25 M KCl	10 ml

---

ad. H<sub>2</sub>O

970 ml

\* pH-Wert auf 7.0 einstellen, autoklavieren, auf Raumtemperatur abkühlen lassen, Zugabe von 10 ml einer sterilen 1 M MgCl<sub>2</sub>-Lösung und 20 ml steril-filtrierter 1 M Glucose-Lösung.

## 5.2 Allgemeine Herstellung der verwendeten Enzyme

Die nachfolgend aufgeführten Schritte dienten zur Herstellung der *N*-Acetylneuraminsäuresynthasen NeuS<sub>Nme</sub> und NeuS<sub>Cje</sub>, der Pseudaminsäuresynthase PseS<sub>Cje</sub>, der CMP-Sialatsynthase (CSS<sub>Nme</sub>) und der  $\alpha(2,6)$ -Sialyltransferase ( $\alpha(2,6)$ -SiaT<sub>Plc</sub>) (Gensequenzen und Plasmidkarten der Expressionsvektoren für die Sialinsäuresynthasen s. Kap. 6.1).

### 5.2.1 Fermentation

Vor dem eigentlichen Fermentationsschritt wurden zunächst Bakterien aus der entsprechenden Dauerkultur steril auf einer Agarplatte (die mit entsprechenden Antibiotika versehen war) ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Danach wurde ein Klon der jeweiligen Platte, als Vorkultur, in einen Schüttelkolben mit 200 ml LB/TB-Medium überführt und bei 37°C und 180 rpm für 16 Stunden inkubiert. Für die Fermentation, stand je nach Bedarf, ein Fermenter mit einem Gesamtvolumen von 7 Liter als auch Schikanekolben für maximal 3 Liter zur Verfügung. Die Vorkultur wurde am darauffolgenden Tag in den Fermenter oder Schikanekolben überführt, dazu wurde die Vorkultur im Verhältnis 1:40 mit frischem LB/TB Medium versehen und bei 37°C weiter inkubiert, bis die Kultur eine Trübung erreicht hatte die einer „OD<sub>600</sub>“ von etwa 0.6 entsprach. War diese Trübung erreicht, erfolgte durch Zugabe von IPTG die Induktion. Nach einer weiteren 4-5 stündigen Kultivierung erfolgte die Zellernte. Bei Fermentationen im Fermenter erfolgte die Ernte mit Hilfe einer kontinuierlich-laufenden Zentrifuge, bei 6000 g und RT wurde der Fermenterinhalt durch die Zentrifuge gepumpt. Analog verlief die Zellernte bei Fermentation im Schikanekolben, nur wurde hier die Zentrifugation in 250 ml Einheiten durchgeführt. Das Feuchtgewicht der



---

erhaltenen Zellpellets lag zwischen 60-100 g. Die Lagerung bis zum Zellaufschluss erfolgte bei -20°C.

### **5.2.2 Zellaufschluss**

Für den Zellaufschluss standen verschiedene Methoden zur Verfügung. Zum einen der Aufschluss mit Hilfe von Glasperlen in einer Kugelmühle oder durch Ultraschall mit einer Sonode. Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte der Zellaufschluss in den meisten Fällen durch Ultraschall. Mit Hilfe der Sonode konnten bis zu 50 mL Zellsuspension auf einmal aufgeschlossen werden. Zunächst wurde das Zellpellet aufgetaut und im Lysispuffer (20 mM Bicin, 10 mM  $\text{MnCl}_2$ , 0.5 M NaCl, 0.02 mM DTT und Lysozym) resuspendiert. Diese Suspension wurde bei 0°C je nach Größe des Volumens 2-10 Minuten bei maximaler geräteleistung aufgeschlossen. Die Zellfragmente wurden bei 16000 g und 4°C abzentrifugiert. Bis zur weiteren Aufreinigung wurde der Zellüberstand bei -20°C gelagert.

### **5.2.3 Aufreinigung der Enzyme**

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Enzyme waren alle mit einem *N*-terminalen  $\text{His}_{(6-10)}$ -Tag versehen und konnten über Metallchelat-Affinitätschromatographie aufgereinigt werden, dazu wurden Nickel-NTA-Säulen verwendet. Vor der eigentlichen Aufreinigung wurde zunächst die Nickel-NTA-Säule mit einem 20 mM Phosphatpuffer pH 7.4 (0.5 M NaCl) äquilibriert. Die Nickelionen werden durch den vierzähligen Liganden Nitrilo-Triacetat (NTA) am Säulenmaterial, der Sepharose, immobilisiert. Diese besitzen zwei freie Bindungsstellen für den unprotonierten Imidazolstickstoff im Histidin. Für die Aufreinigung wird die Proteinprobe in 20 mM Phosphatpuffer pH 7.4 (0.5 M NaCl und 40 mM Imidazol) aufgenommen und auf die Säule aufgetragen. Nach einem weiteren Waschschriff mit 50 mM Imidazol, um eventuelle Verunreinigungen zu entfernen, wurde das gewünschte Protein über einen steigenden Imidazolgradienten eluiert, die Elution erfolgte je nach Enzyme zwischen 200-350 mM Imidazol. Im letzten Schritt erfolgte noch durch Ultrafiltration ein Pufferwechsel für das jeweilige Enzym, gleichzeitig wurde durch die Ultrafiltration auch das Imidazol entfernt, welches sich in späteren reaktion als störend erweisen kann. Das so aufgereinigte Protein wurde noch an der Lyovac GT-2 lyophilisiert und als voluminöser farbloser Feststoff erhalten, bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.



---

## 5.3 Synthese

### 5.3.1 Allgemeine Arbeitsvorschriften

#### AAV 1a: N-Derivatisierung von D-Mannosamin

In einem Kolben wird unter Schutzgasatmosphäre (Ar-Atmosphäre) 1 Äq.  $\text{ManNH}_2\cdot\text{HCl}$ , 1.1-1.5 Äq.  $\text{NaOMe}$  und 1 Äq.  $\text{Et}_3\text{N}$  in  $\text{MeOH}$  gelöst. Zu dieser Lösung werden 1.2-1.5 Äq. des entsprechenden Carbonsäurederivats, ebenfalls unter Schutzgasatmosphäre (Ar-Atmosphäre) bei RT zugegeben. Die Reaktionsmischung wird 3-24 h weiter bei RT gerührt bis vollständiger oder kein weiterer Umsatz auf der DC-Kontrolle zu erkennen ist. Nach Einengen der Reaktionsmischung wird das Rohprodukt säulenchromatographisch, mit  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  (1:2-1:5) als Laufmittel, aufgereinigt. Das Produkt wird als Gemisch seiner beiden Anomeren erhalten.

Analog zu dieser AAV erfolgen die Synthesen der entsprechenden D-Glucosamin- und D-Galactosamin-Derivate.

#### AAV 1b: N-Derivatisierung von D-Mannosamin

In einem Kolben wird unter Schutzgasatmosphäre (Ar-Atmosphäre) 1 Äq.  $\text{ManNH}_2\cdot\text{HCl}$  und 1 Äq.  $\text{Et}_3\text{N}$  in trockenem  $\text{DMF}$  gelöst, nach 30-45 min. Rühren werden 1.2-1.5 Äq. des entsprechenden Carbonsäurederivats, ebenfalls unter Schutzgasatmosphäre (Ar-Atmosphäre) bei RT zugegeben. Nach weiteren 15 min. rühren wird in der Dunkelheit 1.1 Äq. 1-Hydroxy-benzotriazol (HOBt) zugegeben und der Reaktionskolben in einem Eis-Kochsalz-Bad auf  $0^\circ\text{C}$  gekühlt. Anschließend werden unter Argon 1.2 Äq. *N,N'*-Diisopropylcarbodiimid (DIC) bei  $0^\circ\text{C}$  zugetropft und die Reaktionsmischung für 1-3 h bei  $0^\circ\text{C}$  gerührt und danach über Nacht bei RT solange bis kein weiterer Umsatz auf der DC-Kontrolle zu erkennen ist.

Zur Aufarbeitung wird das Reaktionsgemisch über eine Fritte und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wird in  $\text{H}_2\text{O}$  aufgenommen, zunächst mit  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  und

---

danach mit EE gut extrahiert. Die wässrige Reaktionslösung wird erneut zur Trockne im Vakuum eingengt. Das erhaltene Rohprodukt wird säulenchromatographisch, mit  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  (1:2-1:5) als Laufmittel, aufgereinigt. Das Produkt wird als Gemisch seiner beiden Anomeren erhalten.

Analog zu dieser AAV erfolgen die Synthesen der entsprechenden D-Glucosamin- und D-Galactosamin-Derivate.

#### **AAV 2:      Acetalisierung von (*N*-substituierten) Aminosuktern**

Der (*N*-substituierte) Aminosucker wird in Pyridin (5 ml/mmol Substrat) gelöst mit 4 Äq.  $\text{Ac}_2\text{O}$  versetzt und bei RT für 15 h gerührt. Nach vollständigem Umsatz wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch, mit Cy/EE (1:3) als Laufmittel aufgereinigt.

#### **AAV 3:      Deacetalisierung von *N*-substituierten Aminosuktern**

Der acetylierte Aminosucker wird in MeOH (20 ml/mmol Substrat) gelöst mit NaOMe (35 mg/mmol Substrat) versetzt und 6 h bei RT gerührt, danach für einige Minuten mit wenig  $\text{H}^+$ -Ionenaustauscher versetzt weiter gerührt. Das Ionenaustauscherharz wird abfiltriert, mit wenig MeOH nachgewaschen und die vereinigten methanolischen Phasen eingedampft. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch mit Cy/EE (1:3) als Laufmittel aufgereinigt.

#### **AAV 4:      [CuAAC]-Cycloaddition „Click-Reaktion“**

Das Acridonpnethylazid (1-1.2 Äq.) wird in EtOH gelöst. Zu dieser Lösung wird das entsprechende Alkin (1 Äq.), im gleichen Lösungsmittel gelöst, zugetropft. Der dabei entstehenden klaren homogenen Reaktionsmischung wird nun zunächst eine wässrige  $\text{CuSO}_4$ -Lösung (0.2-1 Äq.) und danach eine wässrige Na-Ascorbat-Lösung (0.2-1 Äq.) zugegeben. Die Reaktionsmischung wird 2 h bis über Nacht bei RT gerührt bis ein vollständiger Umsatz auf der DC-Kontrolle zu beobachten ist. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum wird das erhaltene säulenchromatographisch, mit  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  (1:3) als Laufmittel, aufgereinigt

---

### **AAV 5a:     Enzymatische Synthese von Sialinsäuren und Derivaten mit den Sialinsäuresynthasen NeuS<sub>Nme</sub>, NeuS<sub>Cje</sub> und PseS<sub>Cje</sub>**

In einem Kolben werden die entsprechenden *N*-substituierten Aminosuckerderivate (1 Äq.) in Bicin-Puffer (50 mM pH 8.0 mit 10 mM MnCl<sub>2</sub>) gelöst und 1.1 Äq. Phosphoenolpyruvat, in Form einer 1 M wässrigen Lösung, zugegeben. Der pH-Wert der Reaktionsmischung wird kontrolliert und bei Bedarf mit 1 M NaOH-Lösung auf 8.0 eingestellt. Anschließend wird das entsprechende lyophilisierte Enzym (NeuS<sub>Nme</sub>; NeuS<sub>Cje</sub> oder PseS<sub>Cje</sub>) zugegeben und die Reaktionslösung bei 180 rpm und 37°C für 24-168 h inkubiert.

Wenn auf der DC-Kontrolle vollständiger oder kein weiterer Umsatz zu beobachten ist, wird die Reaktionsmischung mit eiskaltem EtOH (9-10facher Überschuss des Reaktionsvolumens) versetzt und 20 min. bei -4°C im Eisschrank gelagert zur Denaturierung des Enzymes. Ausgefallenes Protein und Phosphatsalz wird abfiltriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das erhaltene Rohprodukt wird in H<sub>2</sub>O aufgenommen und säulenchromatographisch aufgereinigt. Zunächst wird das Produkt über eine Anionenaustauschersäule mit einem Ameisensäuregradienten (0-2 M) eluiert. Zum Entfernen des Formiates wird nochmals über eine Kationenaustauschersäule aufgereinigt, das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und das Produkt lyophilisiert.

### **AAV 5b:     Enzymatische Kaskadensynthese von *N*-Acetylneuraminsäure und Derivaten mit AGE<sub>Ava</sub> und NeuS<sub>Nme</sub>/NeuS<sub>Cje</sub>**

In einem Rundkolben wird ein Äquivalent des entsprechenden *N*-modifizierten Glucosaminderivates in 40 ml 50 mM Bicin Puffer pH 8.0 mit 10 mM MnCl<sub>2</sub> gelöst vorgelegt. Die Endkonzentration der Glucosaminderivate beträgt in jeder Synthese 90 mM diese Konzentration entspricht dem 4,8-fachen K<sub>M</sub>-Wert des natürlichen Substrates GlcNAc der AGE<sub>Ava</sub> (K<sub>M</sub>(GlcNAc)= 18.8 mM<sup>[113]</sup>). Zu dieser Lösung werden 1.1 Äq. Phosphoenolpyruvate, in Form einer wässrigen 1 M Lösung, und 125 µl 0.1M ATP-Lösung gegeben und der pH-Wert kontrolliert. Nach einer kurzen Inkubation der Reaktionslösung bei 37°C wird als erstes Enzym AGE<sub>Ava</sub> (6 µl/ml) zugegeben, nach weiteren 15 Minuten Inkubation bei 37°C kommt als finales Enzyme die entsprechenden *N*-Acetylneuraminsäuresynthase (NeuS<sub>Nme</sub> 0.01 mg/ml, NeuS<sub>Cje</sub> 0.02 mg/ml) hinzu. Der

---

pH-Wert wird nochmals kontrolliert und die Reaktionslösung bei 37°C und 180 rpm inkubiert. Der Reaktionsfortschritt wird dünnschichtchromatographisch verfolgt. Ist kein weiterer Umsatz zu beobachten wird die Reaktion beendet. Die Enzyme werden mittels Ethanolpräzipitation oder säulenchromatographisch über eine Biogel-Säule entfernt. Das erhaltene Rohprodukt wird in H<sub>2</sub>O aufgenommen und säulenchromatographisch aufgereinigt. Zunächst wird das Produkt über eine Anionenaustauschersäule mit einem Ameisensäuregradienten (0-2 M) eluiert. Zum Entfernen des Formiates wird nochmals über eine Kationenaustauschersäule aufgereinigt, das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und das Produkt lyophilisiert.

#### **AAV 6: CMP-Aktivierung und Sialyltransfer in der Kaskade**

Die Neuraminsäure (4 ~ 8 Äq.) und CTP (4.8 ~ 9.6 Äq.) werden in Tris-Puffer (50 mM pH 8.5 mit 50 mM MgCl<sub>2</sub>) gelöst. Der pH-Wert der Lösung wird kontrolliert, bei Bedarf mit 1 M NaOH wieder auf pH= 8.5 eingestellt, danach die Enzyme CMP-Sialat-Synthase (CSS) und anorganische Pyrophosphatase (5U) zugegeben. Die Reaktionsmischung wird bei 37°C unter ständiger pH-Wertkontrolle geschüttelt bis vollständiger Umsatz auf der DC-Kontrolle zu beobachten ist. Die Reaktionsmischung wird zentrifugiert, danach der Überstand in eine Lösung des Lactosids (1 Äq. als Sialylakzeptor) im gleichen Puffer gegeben. Nach erneuter Kontrolle und Einstellen des pH-Wertes mit 1 M NaOH auf 8.5 werden die Enzyme alkalische Phosphatase und  $\alpha$ -2,6-Sialyltransferase ( $\alpha$ -2,6-SiaT) zugegeben. Die Reaktionsmischung wird bei 30°C unter ständiger Kontrolle des pH-Wertes geschüttelt bis kein weiterer oder vollständiger Umsatz auf der DC-Kontrolle zu beobachten ist. Die entstandenen Salze werden abfiltriert und das Wasser im Vakuum eingeeengt. Danach wird das Rohprodukt säulenchromatographisch aufgereinigt über RP-C18-Kieselgel und mit einem MeOH-Gradienten von 5-50% eluiert. Das Produkt wird in wenig H<sub>2</sub>O aufgenommen und lyophilisiert.

#### **AAV 7: Kinetische Studien mit den Sialinsäuresynthasen NeuS<sub>Nme</sub>, NeuS<sub>Cje</sub> und PseS<sub>Cje</sub>**

Die kinetischen Studien mit den Sialinsäuresynthasen werden sowohl in Küvetten (Endvolumen 300  $\mu$ l) als auch in 96-Lochplatten (Endvolumen 200  $\mu$ l) durchgeführt. Alle

---

verwendeten Reagentien, ausschließlich des Puffers 50 mM Bicin pH 8.0, werden frisch angesetzt in einem Volumen, dass sie möglichst schnell aufgebraucht werden. Spätestens nach zweimaligem Einfrieren/Auftauen werden die Lösungen verworfen.

Vor den eigentlichen Messungen sollen folgenden Lösungen, hergestellt in 50 mM Bicin pH 8.0; parat stehen:

0.1 M/1 M	Zucker
0.1 M/1 M	PEP
0.01 M	NADH
0.1 M	DTT
2 M	MnCl <sub>2</sub>
1 U/ $\mu$ l	LDH
10 U/ $\mu$ l	NeuA
5-20 mg/ml	NeuS <sub>Nme</sub> , NeuS <sub>Cje</sub> oder PseS <sub>Cje</sub>

Sind diese Lösungen vorhanden, werden in der Küvette oder der 96-Lochplatte zunächst alle Komponenten ausser den Sialinsäuresynthase vorgelegt und für ein bis zwei Minuten bei 37°C inkubiert.

Für jede einzelne Messung wird NADH in der Endkonzentration 0.25 mM, DTT in der Endkonzentration 1 mM, MnCl<sub>2</sub> in der Endkonzentration 10 mM, 1 Unit LDH und 10 Units NeuA eingesetzt. Für kinetische Studien mit den Zuckern wird zusätzlich PEP in der Endkonzentration 5 mM zugefügt, bei kinetischen Studien mit PEP wird ManNAc in der Endkonzentration 20 mM verwendet. Für diese Komponenten bietet es sich für ein schnelleres Arbeiten an, einen Master-Mix anzusetzen (Anzahl der Messungen plus 2).

Je nachdem, welcher Zucker oder welches Zuckerderivat untersucht werden soll, werden in der Küvette oder der 96-Lochplatte dieser in einem Konzentrationsbereich bis zu 500 mM vorgelegt. Das fehlende Volumen in der Küvette/Well wird mit 50 mM Bicin pH 8.0 aufgefüllt, hierbei ist zu Beachten das noch fehlenden Volumen der Sialinsäuresynthasen-Lösungen. Das jeweilige Endvolumen soll nicht überschritten werden.

Nach der kurzen Inkubationszeit bei 37°C wird durch Zugabe der Sialinsäuresynthase die Messung gestartet und die Absorptionsabnahme von NADH bei  $\lambda = 340$  nm verfolgt. Jeder Messpunkt wird über eine Dreifachbestimmung verifiziert, zusätzlich werden eine Positivkontrolle und eine Negativkontrolle gemessen. Die Negativkontrolle enthält alle Komponenten ausser dem Zucker und dient dazu, die langsame Hintergrundhydrolyse des

---

NADH zu ermitteln. Die Positivkontrolle mit dem natürlichen Substrat ManNAc dient zur Überprüfung, ob das System funktioniert.

Die Auswertung der gemessenen Kurven/Rohdaten erfolgt mit Hilfe des Programms Origin und einem Fit an eine Michaelis-Menten-Kinetik. Für die korrekte Auswertung der Daten wird zusätzlich noch eine Eichgerade zur NADH-Absorption bei verschiedenen Konzentrationen nötig, diese wird im Vorfeld der eigentlichen Messungen aufgenommen.

### 5.3.2 Präparative Synthesen

#### Phosphoenolpyruvat-monokaliumsalz (1)

##### Synthese der Vorstufe Brombrenztraubensäure

In einem 4-Liter Dreihalskolben werden unter starkem Rühren 480 g (5.45 Mol; 1 Äq.) Brenztraubensäure langsam in 450 ml Dichlormethan gelöst und mit etwa 20 Tropfen konzentrierter  $\text{H}_2\text{SO}_4$  versetzt. An die Apparatur werden nun Waschflaschen angeschlossen, die zweite davon mit einer NaOH-Lösung gefüllt, bevor zu der entstandenen gelben Lösung über einen Tropftrichter mit Druckausgleich langsam über einen Zeitraum von 3.5-4 Stunden bei RT 265 ml (10.46 Mol, 2 Äq.) Brom tropfenweise so zugegeben wie es verbraucht wird. Im Laufe der Zugabe fällt ein weißer Feststoff aus. Ist die Zugabe beendet, wird die Suspension noch eine weitere Stunden bei RT gerührt und dann mit 40 mL Cyclohexan und 200 ml Petrolether gequenchet. In einem sehr gut funktionierenden Abzug wird die Reaktionslösung auf Eis gekühlt und danach scharf abgesaugt, mit eiskaltem Petrolether mehrmals gewaschen und über Nacht im Exsikkator getrocknet.

##### Synthese von Phosphoenolpyruvat-monokaliumsalz

In einem weiteren 4-Liter Dreihalskolben werden 185 ml (1.56 M; 1.3 Äq.) Trimethylphosphit in 1280 ml getrocknetem  $\text{Et}_2\text{O}$  gelöst. Zu dieser Lösung werden über einen Tropftrichter mit Druckausgleich 250 g (1.49 M; 1 Äq.) Brombrenztraubensäure, gelöst in 415 ml getrocknetem  $\text{Et}_2\text{O}$ , so zugetropft, dass der Diethylether gelinde siedet. Nach Ende der Zugabe wird noch eine weitere Stunde bei RT weitergerührt. Der Diethylether wird am Rotationsverdampfer entfernt, das erhaltene Produkt, ein gelbliches leicht viskoses Öl, in

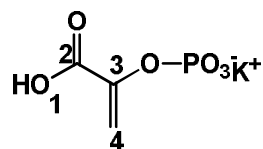


---

550 ml H<sub>2</sub>O gelöst und auf Eis gekühlt. Die gekühlte wässrige Lösung wird langsam mit 88.8 g KOH-Plätzchen versetzt und gerührt bis diese sich vollständig gelöst haben. Während der Zugabe von 850 ml EtOH fällt das PEP-K als gelblicher Feststoff aus. Das Produkt wird abgesaugt, mit mehreren Portion EtOH gewaschen bis es komplett weiß ist und danach für drei Tage im Exsikkator über KOH-Plätzchen getrocknet.

Ausbeute: 135.8 g (77%) als farbloser Feststoff\*

\* Die Synthese wurde mehrfach wiederholt um die komplette Menge an Brombrenztraubensäure umzusetzen.



<sup>1</sup> H-NMR (126 MHz, 300 K, CDCl<sub>3</sub>): δ = 6.21 (s, 1H, 4a-H), 5.65 (s, 1H, 4b-H) ppm.

<sup>13</sup> C-NMR (126 MHz, 300 K, CDCl<sub>3</sub>): δ = 180.60 (C-3), 164.35 (C-2), 107.10 (C-4) ppm.

### **N-Formyl-D-mannosamin (3)**

Ansatz nach AAV 1a

Synthese unter starker Rückflusskühlung bei RT

ManNH<sub>2</sub>\*HCl: 519.6 mg (2.41 mmol, 1 Äq.)

Ameisensäuremethylester: 4.48 ml (72.3 mmol, 30 Äq.)

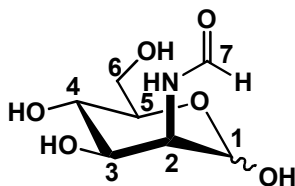
NaOMe: 143.1 mg (2.65 mmol, 1.1 Äq)

Et<sub>3</sub>N: 334 µl (2.41 mmol, 1 Äq.)

MeOH: 20 ml

R<sub>f</sub> = 0.47 (C/M, 2:1)

Ausbeute: 425 mg (85 %) als farbloser Feststoff nach säulenchromatographischer Aufreinigung (C/M 2:1)



$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz, 300 K,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  = 8.21 (s, 1H, 7-H), 5.18 (d,  $J$  = 1.8 Hz, 1H, 1 $\alpha$ -H), 5.03 (d,  $J$  = 1.5 Hz, 1H, 1 $\beta$ -H), 4.49 (dd,  $J$  = 2.2, 4.5 Hz, 1H, 2 $\beta$ -H), 4.42 (dd,  $J$  = 2.2, 4.4 Hz, 1H, 2 $\alpha$ -H), 4.17 (dd,  $J$  = 4.4, 8.7 Hz, 1H, 3 $\alpha$ -H), 3.84-3.80 (m, 3H, 6 $\beta$ -H, 6 $\alpha$ -Ha), 3.78-3.72 (m, 2H, 5 $\alpha$ -H, 6 $\alpha$ -Hb), 3.62 (dd,  $J$  = 4.4, 9.2 Hz, 1H, 3 $\beta$ -H), 3.57 (t,  $J$  = 9.6 Hz, 1H, 4 $\alpha$ -H), 3.51 (t,  $J$  = 9.4 Hz, 1H, 4 $\beta$ -H), 3.27 (t,  $J$  = 2.7 Hz, 1H, 5 $\beta$ -H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$  (126 MHz, 300 K,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  = 176.38 (C-7 $\alpha$ ) 176.35 (C-7 $\beta$ ), 94.26 (C-1 $\alpha$ ), 93.88 (C-1 $\beta$ ), 76.14 (C-5 $\beta$ ), 75.80 (C-5 $\alpha$ ), 74.91 (C-3 $\beta$ ), 71.24 (C-3 $\alpha$ ), 67.88 (C-4 $\alpha$ ), 67.36 (C-4 $\beta$ ), 62.78 (C-6 $\alpha$ ), 62.45 (C-6 $\beta$ ), 56.72 (C-2 $\beta$ ), 54.96 (C-2 $\alpha$ ) ppm.

### **N-Propanoyl-D-mannosamin (4)**

Ansatz nach AAV 1a

ManNH<sub>2</sub>\*HCl: 458.2 mg (2.125 mmol, 1 Äq.)

Propionsäureanhydrid: 407  $\mu\text{l}$  (3.19 mmol, 1.5 Äq.)

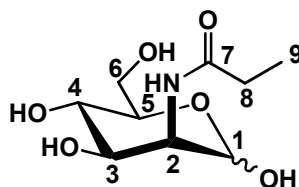
NaOMe: 126.4 mg (2.34 mmol, 1.1 Äq.)

Et<sub>3</sub>N: 294.5  $\mu\text{l}$  (2.125 mmol, 1 Äq.)

MeOH: 20 ml

$R_f$  = 0.44 (C/M, 2:1)

Ausbeute: 310 mg (62 %) als blass gelber Feststoff nach säulenchromatographischer Aufreinigung (C/M 2:1-C/M 1:4)



$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz, 300 K,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  = 5.03 (d,  $J$  = 1.4 Hz, 1H, 1 $\alpha$ -H), 4.98 (d,  $J$  = 1.5 Hz, 1H, 1 $\beta$ -H), 4.53 (dd,  $J$  = 4.8, 2.2 Hz, 1H, 2 $\alpha$ -H), 4.39 (dd,  $J$  = 4.5, 1.7 Hz, 1H, 2 $\beta$ -H), 4.12 (dd,  $J$  = 9.6, 4.2 Hz, 1H, 3 $\alpha$ -H), 3.91-3.77 (m, 5H, 5 $\alpha$ -, 6 $\alpha$ -, 6 $\beta$ -H), 3.66 (dd,  $J$  = 9.7, 4.4 Hz, 1H, 3 $\beta$ -H), 3.63 (t,  $J$  = 9.2 Hz, 1H, 4 $\alpha$ -H), 3.54 (t,  $J$  = 9.4 Hz, 1H, 4 $\beta$ -H), 3.37 (t,  $J$  = 3.4 Hz, 1H, 5 $\beta$ -H), 2.64 (t,  $J$  = 4.5 Hz, 4H, 8 $\alpha$ -H, 8 $\beta$ -H), 1.76 (q,  $J$  = 4.4 Hz, 6H, 9 $\alpha$ -H, 9 $\beta$ -H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$  (126 MHz, 300 K,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  = 174.00 (C-7 $\alpha$ ) 173.95 (C-7 $\beta$ ), 95.05 (C-1 $\alpha$ -, -1 $\beta$ ), 82.07 (C-5 $\beta$ ), 74.39 (C-3 $\beta$ ), 75.25 (C-5 $\alpha$ ), 73.44 (C-3 $\alpha$ ), 71.00 (C-4 $\alpha$ ), 70.96 (C-4 $\beta$ ), 64.87 (C-6 $\alpha$ ), 64.12 (C-6 $\beta$ ), 58.94 (C-2 $\beta$ ), 56.77 (C-2 $\alpha$ ), 34.60 (C-8 $\alpha$ -, -8 $\beta$ ), 29.08 (C-9 $\beta$ ), 29.02 (C-9 $\alpha$ ) ppm.

### **N-Methoxycarbonyl-D-mannosamin (5)**

Ansatz nach **AAV 1a**

ManNH<sub>2</sub>\*HCl: 454.9 mg (2.11 mmol, 1 Äq.)

Chlormethylformiat: 245.2  $\mu\text{l}$  (3.165 mmol, 1.5 Äq.)

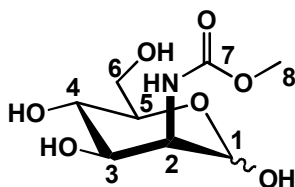
NaOMe: 125.3 mg (2.32 mmol, 1.1 Äq)

Et<sub>3</sub>N: 292.4  $\mu\text{l}$  (2.11 mmol, 1 Äq.)

MeOH: 20 ml

$R_f$  = 0.51 (C/M, 2:1)

Ausbeute: 395 mg (79 %) als gelbes Pulver nach säulenchromatographischer Aufreinigung (C/M 2:1)



$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz, 300 K,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  = 5.22 (d,  $J$  = 1.5 Hz, 1H, 1 $\alpha$ -H), 4.97 (d,  $J$  = 1.8 Hz, 1H, 1 $\beta$ -H), 4.35 (dd,  $J$  = 9.7, 4.4 Hz, 1H, 2 $\alpha$ -H), 4.10 (dd,  $J$  = 7.8, 1.5 Hz, 1H, 2 $\beta$ -H), 4.02 (dd,  $J$  = 9.7, 4.5 Hz, 1H, 3 $\alpha$ -H), 3.90-3.78 (m, 5H, 5 $\alpha$ -, 6 $\alpha$ -, 6 $\beta$ -H), 3.75 (dd,  $J$  = 8.7, 4.8 Hz, 1H, 3 $\beta$ -H), 3.72 (t,  $J$  = 9.6 Hz, 1H, 4 $\alpha$ -H), 3.56 (s, 3H, 8-H), 3.54 (t,  $J$  = 9.4 Hz, 1H, 4 $\beta$ -H), 3.48 (ddd,  $J$  = 9.6 Hz, 1H, 5 $\beta$ -H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$  (126 MHz, 300 K,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  = 172.98 (C-7 $\alpha$ ) 172.65 (C-7 $\beta$ ), 93.97 (C-1 $\alpha$ ), 92.82 (C-1 $\beta$ ), 78.15 (C-5 $\beta$ ), 73.70 (C-5 $\alpha$ ), 71.66 (C-3 $\beta$ ), 68.44 (C-3 $\alpha$ ), 66.88 (C-4 $\alpha$ ), 66.96 (C-4 $\beta$ ), 63.00 (C-6 $\alpha$ -, - $\beta$ ), 60.94 (C-2 $\beta$ ), 58.11 (C-2 $\alpha$ ), 49.10 (C-8) ppm.

### **N-Chloroacetyl-D-mannosamin (6)**

Ansatz nach **AAV 1a**

ManNH<sub>2</sub>\*HCl: 422.6 mg (1.96 mmol, 1 Äq.)

Chloressigsäureanhydrid: 302  $\mu\text{l}$  (2.56 mmol, 1.3 Äq.)

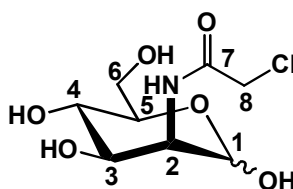
NaOMe: 116.7 mg (2.16 mmol, 1.1 Äq)

Et<sub>3</sub>N: 271.6  $\mu\text{l}$  (1.96 mmol, 1 Äq.)

MeOH: 20 ml

$R_f$  = 0.63 (C/M, 2:1)

Ausbeute: 465.5 mg (93 %) als brauner Feststoff nach säulenchromatographischer Aufreinigung (C/M 2:1)



$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz, 300 K,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  = 5.30 (d,  $J$  = 1.8 Hz, 1H, 1 $\alpha$ -H), 5.13(d,  $J$  = 1.8 Hz, 1H, 1 $\beta$ -H), 4.39 (dd,  $J$  = 4.8, 1.5 Hz, 1H, 2 $\alpha$ -H), 4.35 (s, 2H, 8 $\alpha$ -H), 4.30 (s, 2H, 8 $\beta$ -H), 4.25 (dd,  $J$  = 4.4, 1.8 Hz, 1H, 2 $\beta$ -H), 4.02 (dd,  $J$  = 7.4, 4.5 Hz, 1H, 3 $\alpha$ -H), 3.96-3.89 (m, 3H, 6 $\alpha$ -Ha, 6 $\beta$ -H), 3.83-3.72 (m, 2H, 6 $\alpha$ -Hb, 5 $\alpha$ -H), 3.66 (dd,  $J$  = 9.7, 4.5 Hz, 1H, 3 $\beta$ -H), 3.61 (t,  $J$  = 9.6 Hz, 1H, 4 $\alpha$ -H), 3.54 (t,  $J$  = 7.4 Hz, 1H, 4 $\beta$ -H), 3.46 (t,  $J$  = 3.4 Hz, 1H, 5 $\beta$ -H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$  (126 MHz, 300 K,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  = 174.70 (C-7 $\alpha$ ) 174.25(C-7 $\beta$ ), 97.29 (C-1 $\alpha$ ), 96.90(C-1 $\beta$ ), 83.44 (C-5 $\beta$ ), 79.35 (C-3 $\beta$ ), 76.76 (C-5 $\alpha$ ), 73.44 (C-3 $\alpha$ ), 71.57 (C-4 $\alpha$ ), 70.96 (C-4 $\beta$ ), 63.54 (C-6 $\alpha$ , -6 $\beta$ ), 59.17 (C-2 $\beta$ ), 56.80 (C-2 $\alpha$ ), 44.25 (C-8 $\alpha$ ), 43.00 (C-8 $\beta$ ) ppm.

### **N-Propionyl-D-mannosamin (7)**

Ansatz nach **AAV 1b**

ManNH<sub>2</sub>\*HCl: 465.7 mg (2.16 mmol, 1 Äq.)

Propiolsäure: 200.5  $\mu\text{l}$  (3.24 mmol, 1.5 Äq.)

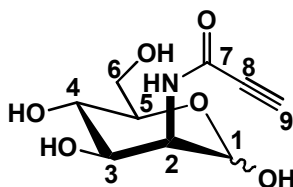
Et<sub>3</sub>N: 299.4  $\mu\text{l}$  (2.16mmol, 1 Äq.)

DIC: 401 $\mu\text{l}$  (2.59 mmol, 1.2 Äq.)

DMF\*: 20 ml

$R_f$  = 0.55 (C/M, 2:1)

Ausbeute: 456 mg (91 %) als bräunlicher Feststoff nach säulenchromatographischer Aufreinigung (C/M 2:1-C/M 1:4)



$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz, 300 K,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  = 5.45 (d,  $J$  = 1.6 Hz, 1H,  $1\alpha\text{-H}$ ), 5.36 (d,  $J$  = 1.5 Hz, 1H,  $1\beta\text{-H}$ ), 4.91 (dd,  $J$  = 4.7, 1.5 Hz, 1H,  $2\beta\text{-H}$ ), 4.84 (dd,  $J$  = 4.5, 1.8 Hz, 1H,  $2\alpha\text{-H}$ ), 4.66 (dd,  $J$  = 9.4, 4.8 Hz, 1H,  $3\alpha\text{-H}$ ), 4.38-4.20 (m, 5H,  $5\alpha\text{-}$ ,  $6\alpha\text{-}$ ,  $6\beta\text{-H}$ ), 4.16 (dd,  $J$  = 8.7, 4.8 Hz, 1H,  $3\beta\text{-H}$ ), 4.05 (t,  $J$  = 9.6 Hz, 1H,  $4\alpha\text{-H}$ ), 3.91 (t,  $J$  = 9.4 Hz, 1H,  $4\beta\text{-H}$ ), 3.56 (s, 1H,  $9\alpha\text{-H}$ ,  $9\beta\text{-H}$ ), 3.53 (t,  $J$  = 3.4 Hz, 1H,  $5\beta\text{-H}$ ) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$  (126 MHz, 300 K,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  = 171.05 (C-7 $\alpha$ ) 170.94 (C-7 $\beta$ ), 95.12 (C-1 $\alpha$ ), 95.08 (C-1 $\beta$ ), 83.46 (C-8), 79.88 (C-5 $\beta$ ), 78.30 (C-3 $\beta$ ), 75.63 (C-5 $\alpha$ ), 73.14 (C-3 $\alpha$ ), 71.00 (C-4 $\alpha$ ), 70.54 (C-4 $\beta$ ), 69.99 (C-9), 66.87 (C-6 $\alpha$ , - $\beta$ ), 54.94 (C-2 $\beta$ ), 52.70 (C-2 $\alpha$ ) ppm.

### **N-Azidoacetyl-D-mannosamin (8)**

Ansatz nach **AAV 1b**

$\text{ManNH}_2\cdot\text{HCl}$ : 2 g (9.276 mmol, 1 Äq.)

Azidoessigsäure: 1.405 g (13.90 mmol, 1.5 Äq.)

$\text{Et}_3\text{N}$ : 1.5 ml (9.276 mmol, 1 Äq.)

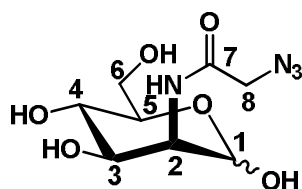
HOBt: 1.379 g (10.20 mmol, 1.1 Äq.)

DIC: 1.723 ml (11.12 mmol, 1.2 Äq.)

DMF\*: 60 ml

$R_f$  = 0.52 (C/M, 2:1)

Ausbeute: 2.186 g (90 %) als farbloser Schaum nach säulenchromatographischer Aufreinigung (C/M 5:1)



$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz, 300 K,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  = 5.10 (d,  $J$  = 1.5 Hz, 1H, 1 $\alpha$ -H), 5.00 (d,  $J$  = 1.6 Hz, 1H, 1 $\beta$ -H), 4.45 (dd,  $J$  = 4.4, 1.5 Hz, 1H, 2 $\alpha$ -H), 4.32 (dd,  $J$  = 4.4, 1.8 Hz, 1H, 2 $\beta$ -H), 4.08-4.00 (m, 5H, 8 $\alpha$ -, 8 $\beta$ - 3 $\alpha$ -H), 3.86-3.77 (m, 5H, 6 $\alpha$ -, 5 $\alpha$ -, 3 $\beta$ -, 6 $\beta$ -Ha), 3.75 (dd,  $J$  = 12.3, 5.1 Hz, 1H, 6 $\beta$ -Hb), 3.56 (t,  $J$  = 9.6 Hz, 1H, 4 $\alpha$ -H), 3.45 (t,  $J$  = 9.8 Hz, 1H, 4 $\beta$ -H), 3.42-3.34 (m, 1H, 5 $\beta$ -H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$  (126 MHz, 300 K,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  = 171.83 (C-7 $\alpha$ ) 170.94 (C-7 $\beta$ ), 92.91 (C-1 $\alpha$ ), 92.82 (C-1 $\beta$ ), 76.38 (C-5 $\beta$ ), 72.02 (C-5 $\alpha$ ), 71.97 (C-3 $\beta$ ), 68.81 (C-3 $\alpha$ ), 66.75 (C-4 $\alpha$ ), 66.52 (C-4 $\beta$ ), 60.41 (C-6 $\alpha$ ), 60.39 (C-6 $\beta$ ), 54.27 (C-2 $\beta$ ), 53.37 (C-2 $\alpha$ ), 51.72 (C-8 $\alpha$ ), 51.64 (C-8 $\beta$ ) ppm.

### **N-Glycolyl-D-mannosamin (9)**

Ansatz nach **AAV 1b**

ManNH<sub>2</sub>\*HCl: 2 g (9.28 mmol, 1 Äq.)

Glucolsäure: 706 mg (9.28 mmol, 1. Äq.)

Et<sub>3</sub>N: 1.5 ml (10.82 mmol, 1.2 Äq.)

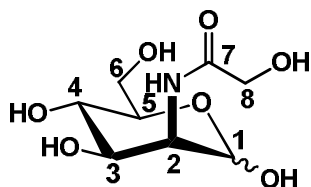
HOBt: 1.398 g (10.2 mmol, 1.1 Äq)

DIC: 1.725 ml (11.12 mmol, 1.2 Äq.)

DMF\*: 50 ml

$R_f$  = 0.43 (C/M, 2:1)

Ausbeute: 1.19 g (54 %) als leicht gelblicher Feststoff nach säulenchromatographischer Aufreinigung (C/M 2:1)



$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz, 300 K,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  = 5.04 (d,  $J$  = 1.5 Hz, 1H,  $1\alpha\text{-H}$ ), 4.93 (d,  $J$  = 1.5 Hz, 1H,  $1\beta\text{-H}$ ), 4.44-4.42 (3H,  $2\alpha\text{-H}$ ,  $8\text{a-H}$ ,  $8\text{b-H}$ ), 4.30 (dd,  $J$  = 4.5, 1.5 Hz, 1H,  $2\beta\text{-H}$ ), 4.02 (dd,  $J$  = 9.7, 4.5 Hz, 1H,  $3\alpha\text{-H}$ ), 3.91-3.85 (m, 3H,  $6\beta\text{-H}$ ,  $6\alpha\text{-Ha}$ ), 3.80-3.77 (m, 2H,  $6\alpha\text{-Hb}$ ,  $5\alpha\text{-H}$ ), 3.66 (dd,  $J$  = 9.7, 4.5 Hz, 1H,  $3\beta\text{-H}$ ), 3.61 (t,  $J$  = 9.6 Hz, 1H,  $4\alpha\text{-H}$ ), 3.54 (t,  $J$  = 9.4 Hz, 1H,  $4\beta\text{-H}$ ), 3.33 (t,  $J$  = 3.4 Hz, 1H,  $5\beta\text{-H}$ ) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$  (126 MHz, 300 K,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  = 178.90 (C-7 $\alpha$ ) 178.25(C-7 $\beta$ ), 97.05(C-1 $\alpha$ ), 96.90(C-1 $\beta$ ), 83.44 (C-5 $\beta$ ), 79,35 (C-3 $\beta$ ), 76.76 (C-5 $\alpha$ ), 73.44 (C-3 $\alpha$ ), 71.57 (C-4 $\alpha$ ), 70.96 (C-4 $\beta$ ), 64.80 (C-8 $\alpha$ , -8 $\beta$ ) 63.54 (C-6 $\alpha$ , -6 $\beta$ ), 58.24 (C-2 $\beta$ ), 56.80 (C-2 $\alpha$ ) ppm.

## 2-Acetamido-2-deoxy-D-glucose (10)

Ansatz nach AAV 1a

GlcNH<sub>2</sub>\*HCl: 2.44 g (11.30 mmol, 1 Äq.)

Acetanhydrid: 1.6 ml (16.95 mmol, 1.5 Äq.)

NaOMe: 671.4 mg (12.43 mmol, 1.1 Äq)

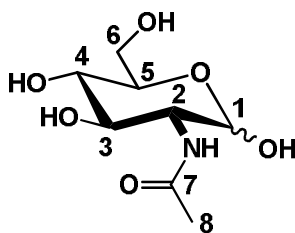
Et<sub>3</sub>N: 1.55 ml (11.30 mmol, 1 Äq.)

MeOH: 50 ml

$R_f$  = 0.40 (C/M, 2:1)

Ausbeute: 1.5 g (60 %) als farbloses Pulver nach säulenchromatographischer Aufreinigung (C/M 2:1-C/M 1:3)





$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz, 300 K,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  = 5.24 (d,  $J$  = 1.8 Hz, 1H,  $1\alpha\text{-H}$ ), 5.05 (d,  $J$  = 1.8 Hz, 1H,  $1\beta\text{-H}$ ), 4.10 (dd,  $J$  = 9.4, 4.8 Hz, 1H,  $3\alpha\text{-H}$ ), 3.90 (dd,  $J$  = 7.4, 1.8 Hz, 1H,  $2\beta\text{-H}$ ), 3.85-3.71 (m, 7H,  $6\alpha$ ,  $6\beta$ ,  $5\alpha$ ,  $3\beta$ ,  $2\alpha\text{-H}$ ), 3.62 (t,  $J$  = 9.6 Hz, 1H,  $4\alpha\text{-H}$ ), 3.56 (t,  $J$  = 9.6 Hz, 1H,  $4\beta\text{-H}$ ), 3.43 (ddd,  $J$  = 9.8, 5.5, 2.2 Hz, 1H,  $5\beta\text{-H}$ ), 2.56 (s, 3H,  $8\beta\text{-H}$ ), 2.55 (s, 3H,  $8\alpha\text{-H}$ ) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$  (126 MHz, 300 K,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  = 176.50 (C-7 $\alpha$ ) 176.45 (C-7 $\beta$ ), 93.97 (C-1 $\alpha$ ), 92.82 (C-1 $\beta$ ), 76.45 (C-5 $\beta$ ), 73.70 (C-5 $\alpha$ ), 71.66 (C-3 $\beta$ ), 68.44 (C-3 $\alpha$ ), 66.88 (C-4 $\alpha$ ), 66.96 (C-4 $\beta$ ), 60.78 (C-6 $\alpha$ , -6 $\beta$ ), 58.94 (C-2 $\beta$ ), 56.77 (C-2 $\alpha$ ), 31.64 (C-8 $\alpha$ ), 31.55 (C-8 $\beta$ ) ppm.

### **N-Formyl-D-glucosamin (11)**

Ansatz nach **AAV 1a**

Synthese unter starker Rückflusskühlung bei RT

GlcNH<sub>2</sub>\*HCl: 1.56 g (7.24 mmol, 1 Äq.)

Ameisensäuremethylester: 13.44 ml (217.2 mmol, 30 Äq.)

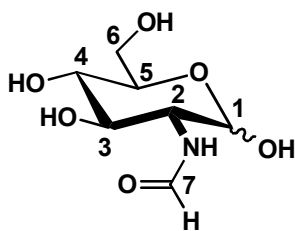
NaOMe: 429.9 mg (7.96 mmol, 1.1 Äq)

Et<sub>3</sub>N: 1.00 ml (7.24 mmol, 1 Äq.)

MeOH: 36.5 ml

$R_f$  = 0.52 (C/M, 2:1)

Ausbeute: 1.35 g (90 %) als farbloses Pulver



$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz, 300 K,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  = 8.05 (s, 1H, 7-H), 5.02 (d,  $J$  = 1.5 Hz, 1H, 1 $\alpha$ -H), 4.90 (d,  $J$  = 1.8 Hz, 1H, 1 $\beta$ -H), 4.42 (dd,  $J$  = 2.2, 4.5 Hz, 1H, 2 $\beta$ -H), 4.36 (dd,  $J$  = 2.2, 4.4 Hz, 1H, 2 $\alpha$ -H), 4.10 (dd,  $J$  = 4.8, 9.6 Hz, 1H, 3 $\alpha$ -H), 3.87-3.81 (m, 3H, 6 $\beta$ -H, 6 $\alpha$ -Ha), 3.78-3.72 (m, 2H, 5 $\alpha$ -H, 6 $\alpha$ -Hb), 3.67 (dd,  $J$  = 4.4, 9.6 Hz, 1H, 3 $\beta$ -H), 3.61 (t,  $J$  = 9.6 Hz, 1H, 4 $\alpha$ -H), 3.51 (t,  $J$  = 9.4 Hz, 1H, 4 $\beta$ -H), 3.27 (t,  $J$  = 3.4 Hz, 1H, 5 $\beta$ -H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$  (126 MHz, 300 K,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  = 166.90 (C-7 $\alpha$ ) 166.35 (C-7 $\beta$ ), 94.50 (C-1 $\alpha$ , C-1 $\beta$ ), 78.75 (C-5 $\beta$ ), 74.90 (C-3 $\beta$ ), 73.80 (C-5 $\alpha$ ), 71.24 (C-3 $\alpha$ ), 67.88 (C-4 $\alpha$ ), 67.36 (C-4 $\beta$ ), 62.78 (C-6 $\alpha$ ), 62.45 (C-6 $\beta$ ), 56.72 (C-2 $\beta$ ), 54.96 (C-2 $\alpha$ ) ppm.

## N-Propanoyl-D-glucosamin (12)

Ansatz nach AAV 1a

GlcNH<sub>2</sub>\*HCl: 1.375 g (6.38 mmol, 1 Äq.)

Propionsäureanhydrid: 1.06 ml (8.29 mmol, 1.3 Äq.)

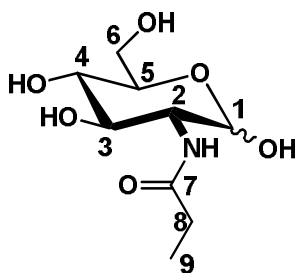
NaOMe: 379.2 mg (7.02 mmol, 1.1 Äq.)

Et<sub>3</sub>N: 884.3  $\mu\text{l}$  (6.38 mmol, 1 Äq.)

MeOH: 50 ml

$R_f$  = 0.44 (C/M, 2:1)

Ausbeute: 1.02 g (68 %) als leicht gelblicher Feststoff nach säulenchromatographischer Aufreinigung (C/M 2:1-C/M 1:3)



<sup>1</sup> H-NMR (500 MHz, 300 K, D<sub>2</sub>O):  $\delta$  = 5.14 (d,  $J$  = 1.8 Hz, 1H, 1 $\alpha$ -H), 4.95 (d,  $J$  = 1.8 Hz, 1H, 1 $\beta$ -H), 4.41 (dd,  $J$  = 4.6, 1.5 Hz, 1H, 2 $\alpha$ -H), 4.30 (dd,  $J$  = 4.5, 1.5 Hz, 1H, 2 $\beta$ -H), 4.02 (dd,  $J$  = 9.7, 4.5 Hz, 1H, 3 $\alpha$ -H), 3.91-3.85 (m, 3H, 6 $\beta$ -H, 6 $\alpha$ -Ha), 3.80-3.77 (m, 2H, 6 $\alpha$ -Hb, 5 $\alpha$ -H), 3.66 (dd,  $J$  = 9.7, 4.5 Hz, 1H, 3 $\beta$ -H), 3.61 (t,  $J$  = 9.6 Hz, 1H, 4 $\alpha$ -H), 3.54 (t,  $J$  = 9.4 Hz, 1H, 4 $\beta$ -H), 3.33 (t,  $J$  = 3.4 Hz, 1H, 5 $\beta$ -H), 2.47 (t,  $J$  = 4.5 Hz, 4H, 8 $\alpha$ -H, 8 $\beta$ -H), 1.39 (q,  $J$  = 7.4 Hz, 6H, 9 $\alpha$ -H, 9 $\beta$ -H) ppm.

<sup>13</sup> C-NMR (126 MHz, 300 K, D<sub>2</sub>O):  $\delta$  = 173.85 (C-7 $\alpha$ ) 173.10 (C-7 $\beta$ ), 93.55 (C-1 $\alpha$ ), 93.02 (C-1 $\beta$ ), 80.00 (C-5 $\beta$ ), 77.55 (C-3 $\beta$ ), 75.25 (C-5 $\alpha$ ), 73.44 (C-3 $\alpha$ ), 71.00 (C-4 $\alpha$ ), 70.96 (C-4 $\beta$ ), 64.87 (C-6 $\alpha$ , -6 $\beta$ ), 58.94 (C-2 $\beta$ ), 56.77 (C-2 $\alpha$ ), 38.65 (C-8 $\alpha$ ), 38.60 (C-8 $\beta$ ), 26.74 (C-9 $\beta$ ), 26.72 (C-9 $\alpha$ ) ppm.

### **N-Methoxycarbonyl-D-glucosamin (13)**

Ansatz nach **AAV 1a**

GlcNH<sub>2</sub>\*HCl: 908.8 mg (4.215 mmol, 1 Äq.)

Methylchlorformiat: 489.5  $\mu$ l (6.32 mmol, 1.5 Äq.)

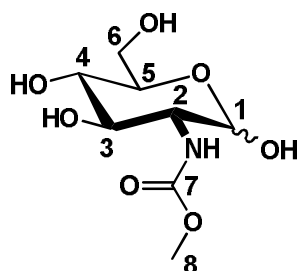
NaOMe: 250.6 mg (4.64 mmol, 1.1 Äq)

Et<sub>3</sub>N: 584.2  $\mu$ l (4.215 mmol, 1 Äq.)

MeOH: 50 ml

$R_f$  = 0.58 (C/M, 2:1)

Ausbeute: 580 mg (58 %) als farbloser Feststoff nach säulenchromatographischer Aufreinigung (C/M 2:1-C/M 1:3)



$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz, 300 K,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  = 5.46 (d,  $J$  = 1.8 Hz, 1H,  $1\alpha\text{-H}$ ), 5.27 (d,  $J$  = 1.8 Hz, 1H,  $1\beta\text{-H}$ ), 4.23 (dd,  $J$  = 9.4, 4.8 Hz, 1H,  $2\alpha\text{-H}$ ), 4.08 (dd,  $J$  = 7.4, 1.8 Hz, 1H,  $2\beta\text{-H}$ ), 4.02 (dd,  $J$  = 9.7, 4.5 Hz, 1H,  $3\alpha\text{-H}$ ), 3.96-3.88 (m, 5H,  $5\alpha\text{-}$ ,  $6\alpha\text{-}$ ,  $6\beta\text{-H}$ ), 3.76 (dd,  $J$  = 9.7, 4.5 Hz, 1H,  $3\beta\text{-H}$ ), 3.72 (t,  $J$  = 9.6 Hz, 1H,  $4\alpha\text{-H}$ ), 3.56 (s, 3H, 8-H), 3.54 (t,  $J$  = 9.4 Hz, 1H,  $4\beta\text{-H}$ ), 3.48 (ddd,  $J$  = 9.8, 5.5, 2.2 Hz, 1H,  $5\beta\text{-H}$ ) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$  (126 MHz, 300 K,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  = 176.50 (C-7 $\alpha$ ) 176.45 (C-7 $\beta$ ), 93.97 (C-1 $\alpha$ ), 92.82 (C-1 $\beta$ ), 78.15 (C-5 $\beta$ ), 73.70 (C-5 $\alpha$ ), 71.66 (C-3 $\beta$ ), 68.44 (C-3 $\alpha$ ), 66.88 (C-4 $\alpha$ ), 66.96 (C-4 $\beta$ ), 62.55 (C-6 $\alpha$ , -6 $\beta$ ), 60.94 (C-2 $\beta$ ), 56.77 (C-2 $\alpha$ ), 47.75 (C-8) ppm.

### **N-Methoxycarbonyl-1,3,4,6-tetra-O-acetyl-D-glucosamin (14)**

Ansatz I nach **AAV 2**

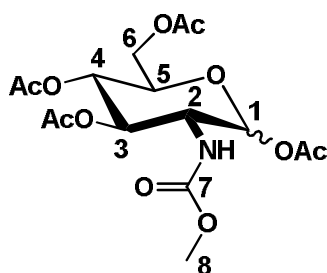
GlcNMethoxycarbonyl (**13**): 200 mg (0.84 mmol, 1 Äq.)

Acetanhydrid: 317.6  $\mu\text{l}$  (3.36 mmol, 4 Äq.)

Pyridin: 4.2 ml

$R_f$  = 0.59 (Cy/EE, 1:3)

Ausbeute: 197 mg (99 %) als bräunlicher Feststoff nach säulenchromatographischer Aufreinigung (Cy/EE 1:3)



<sup>1</sup> H-NMR (500 MHz, 300 K, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 5.27 (d,  $J$  = 1.6 Hz, 1H, 1 $\alpha$ -H), 5.06 (d,  $J$  = 1.5 Hz, 1H, 1 $\beta$ -H), 4.87 (dd,  $J$  = 4.7, 1.5 Hz, 1H, 2 $\beta$ -H), 4.84 (dd,  $J$  = 4.5, 1.8 Hz, 1H, 2 $\alpha$ -H), 4.66 (dd,  $J$  = 9.4, 4.8 Hz, 1H, 3 $\alpha$ -H), 4.38-4.20 (m, 5H, 5 $\alpha$ -, 6 $\alpha$ -, 6 $\beta$ -H), 4.16 (dd,  $J$  = 8.7, 4.8 Hz, 1H, 3 $\beta$ -H), 4.05 (t,  $J$  = 9.6 Hz, 1H, 4 $\alpha$ -H), 3.91 (t,  $J$  = 9.4 Hz, 1H, 4 $\beta$ -H), 3.56 (s, 1H, 9 $\alpha$ -H, 9 $\beta$ -H), 3.53 (t, 1H, 5 $\beta$ -H), 2.16, 2.14, 2.08, 2.05 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>) ppm.

<sup>13</sup> C-NMR (126 MHz, 300 K, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 173.00 (C-7 $\alpha$ ) 172.94 (C-7 $\beta$ ), 171.97, 171.84, 171.68, 171.39 (COCH<sub>3</sub>), 95.12 (C-1 $\alpha$ ), 95.08 (C-1 $\beta$ ), 83.46 (C-8), 79.88 (C-5 $\beta$ ), 78.30 (C-3 $\beta$ ), 75.63 (C-5 $\alpha$ ), 73.14 (C-3 $\alpha$ ), 71.00 (C-4 $\alpha$ ), 70.54 (C-4 $\beta$ ), 69.99 (C-9), 66.87 (C-6 $\alpha$ -, 6 $\beta$ ), 54.94 (C-2 $\beta$ ), 52.70 (C-2 $\alpha$ ), 20.95, 20.88, 20.81, 20.73, 20.68 (OCH<sub>3</sub>) ppm.

### Ansatz II nach AAV 3

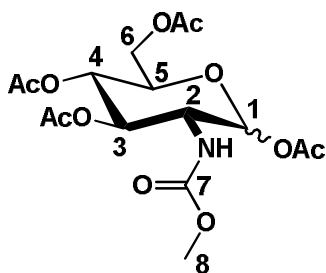
Glc(Ac)<sub>4</sub>NMethoxycarbonyl (**14**): 197 mg (0.486 mmol, 1 Äq.)

NaOMe: 17.01 mg (314.8 mmol, 0.64 Äq.)

MeOH: 9.7 ml

R<sub>f</sub> = 0.30 (Cy/EE, 1:3)

Ausbeute: 190 mg (96 %) von GlcNMethoxycarbonyl (**13**) als farbloser Feststoff nach säulenchromatographischer Aufreinigung (Cy/EE 1:3)



$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz, 300 K,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  = 5.24 (d,  $J$  = 1.8 Hz, 1H, 1 $\alpha$ -H), 5.07 (d,  $J$  = 1.8 Hz, 1H, 1 $\beta$ -H), 4.23 (dd,  $J$  = 9.4, 4.8 Hz, 1H, 2 $\alpha$ -H), 4.08 (dd,  $J$  = 7.4, 1.8 Hz, 1H, 2 $\beta$ -H), 4.02 (dd,  $J$  = 9.7, 4.5 Hz, 1H, 3 $\alpha$ -H), 3.96-3.88 (m, 5H, 5 $\alpha$ -, 6 $\alpha$ -, 6 $\beta$ -H), 3.76 (dd,  $J$  = 9.7, 4.5 Hz, 1H, 3 $\beta$ -H), 3.72 (t,  $J$  = 9.6 Hz, 1H, 4 $\alpha$ -H), 3.56 (s, 3H, 8-H), 3.54 (t,  $J$  = 9.4 Hz, 1H, 4 $\beta$ -H), 3.48 (ddd,  $J$  = 9.8, 5.5, 2.2 Hz, 1H, 5 $\beta$ -H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$  (126 MHz, 300 K,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  = 174.70 (C-7 $\alpha$ ), 174.55 (C-7 $\beta$ ), 96.10 (C-1 $\alpha$ -, -1 $\beta$ ), 78.15 (C-5 $\beta$ ), 73.70 (C-5 $\alpha$ ), 71.66 (C-3 $\beta$ ), 68.44 (C-3 $\alpha$ ), 66.88 (C-4 $\alpha$ ), 66.96 (C-4 $\beta$ ), 62.55 (C-6 $\alpha$ -, -6 $\beta$ ), 61.04 (C-2 $\beta$ ), 56.12 (C-2 $\alpha$ ), 49.00 (C-8) ppm.

### **N-Chloracetyl-D-glucosamin (15)**

Ansatz nach **AAV 1a**

GlcNH<sub>2</sub>\*HCl: 845.2 mg (3.92 mmol, 1 Äq.)

Chloressigsäureanhydrid: 693.8  $\mu\text{l}$  (5.88 mmol, 1.5 Äq.)

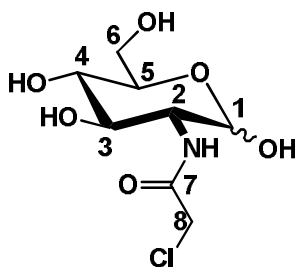
NaOMe: 232.9 mg (4.31 mmol, 1.1 Äq)

Et<sub>3</sub>N: 543.3  $\mu\text{l}$  (3.92 mmol, 1 Äq.)

MeOH: 50 ml

$R_f$  = 0.58 (C/M, 2:1)

Ausbeute: 785 mg (79 %) als farbloser Feststoff nach säulenchromatographischer Aufreinigung (C/M 4:1)



$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz, 300 K,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  = 5.04 (d,  $J$  = 1.5 Hz, 1H,  $1\alpha\text{-H}$ ), 4.93 (d,  $J$  = 1.5 Hz, 1H,  $1\beta\text{-H}$ ), 4.41 (dd,  $J$  = 4.6, 1.5 Hz, 1H,  $2\alpha\text{-H}$ ), 4.35 (s, 2H,  $8\alpha\text{-H}$ ), 4.34 (s, 2H,  $8\beta\text{-H}$ ), 4.30 (dd,  $J$  = 4.5, 1.5 Hz, 1H,  $2\beta\text{-H}$ ), 4.02 (dd,  $J$  = 9.7, 4.5 Hz, 1H,  $3\alpha\text{-H}$ ), 3.91-3.85 (m, 3H,  $6\beta\text{-H}$ ,  $6\alpha\text{-Ha}$ ), 3.80-3.77 (m, 2H,  $6\alpha\text{-Hb}$ ,  $5\alpha\text{-H}$ ), 3.66 (dd,  $J$  = 9.7, 4.5 Hz, 1H,  $3\beta\text{-H}$ ), 3.61 (t,  $J$  = 9.6 Hz, 1H,  $4\alpha\text{-H}$ ), 3.54 (t,  $J$  = 9.4 Hz, 1H,  $4\beta\text{-H}$ ), 3.33 (t,  $J$  = 3.4 Hz, 1H,  $5\beta\text{-H}$ ) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$  (126 MHz, 300 K,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  = 178.90 (C-7 $\alpha$ ) 178.25(C-7 $\beta$ ), 97.05(C-1 $\alpha$ ), 96.90(C-1 $\beta$ ), 83.44 (C-5 $\beta$ ), 79,35 (C-3 $\beta$ ), 76.76 (C-5 $\alpha$ ), 73.44 (C-3 $\alpha$ ), 71.57 (C-4 $\alpha$ ), 70.96 (C-4 $\beta$ ), 63.54 (C-6 $\alpha$ , -6 $\beta$ ), 58.24 (C-2 $\beta$ ), 56.80 (C-2 $\alpha$ ), 44.35 (C-8 $\alpha$ ), 44.34 (C-8 $\beta$ ) ppm.

### **N-Propinoyl-D-glucosamin (16)**

Ansatz nach **AAV 1b**

Ansatz I:

GlcNH<sub>2</sub>\*HCl: 4,34 g (20.11 mmol, 1 Äq.)

Propiolsäure: 1.86 ml (30.17 mmol, 1.5 Äq.)

Et<sub>3</sub>N: 2.78 ml (20.11 mmol, 1 Äq.)

HOBt: 2.99 g (22.12 mmol, 1.1 Äq)

DIC: 3.74 ml (24.13 mmol, 1.2 Äq.)

DMF\*: 50 ml

$R_f$  = 0.4 (C/M, 2:1)

The chemical structure shows a pyranose ring (atoms 1-6) with a hydroxyl group at C1 (atom 1), a hydroxyl group at C2 (atom 2), a hydroxyl group at C3 (atom 3), a hydroxyl group at C4 (atom 4), a hydroxyl group at C5 (atom 5), and a hydroxyl group at C6 (atom 6). The ring is connected via an oxygen atom (atom 7) to a nitrogen atom (atom 8). The nitrogen atom is connected to a carbonyl group (atom 9) which is part of a side chain. The side chain includes a double bond (atom 10) and an oxygen atom (atom 11). The side chain is connected to a benzene ring (atoms 12-15) via a nitrogen atom (atom 13). The benzene ring has a double bond between atoms 12 and 13, and a double bond between atoms 14 and 15.

<sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, 300 K, D<sub>2</sub>O): δ = 167.10 (C-7α), 166.80 (C-7β), 133.42 (C-15), 133.40 (C-10), 132.79 (C-13), 130.40 (C-9α), 130.36 (C-9β), 127.53 (C-12), 114.55 (C-14), 111.70 (C-11), 111.30 (C-8α), 111.06 (C-8β), 95.12 (C-1α), 91.08 (C-1β), 76.17 (C-5β), 74.11 (C-3β), 71.78 (C-5α), 71.00 (C-3α), 70.30 (C-4α), 70.09 (C-4β), 60.95 (C-6α), 60.81 (C-6β), 57.18 (C-2β), 54.54 (C-2α) ppm.

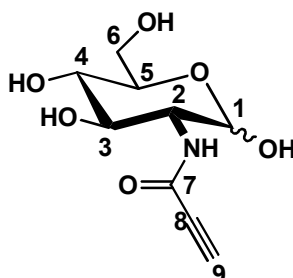
GlcNH<sub>2</sub>\*HCl: 933 mg (4.325 mmol, 1 Äq.)  
 Propiolsäure: 401.4 µl (6.49 mmol, 1.5 Äq.)  
 Et<sub>3</sub>N: 599.5 µl (4.325 mmol, 1 Äq.)  
 DIC: 803.6 µl (5.19 mmol, 1.2 Äq.)  
 DMF\*: 50 ml



---

$R_f = 0.51$  (C/M, 4:1)

Ausbeute: 850 mg (85 %) als farbloses Pulver nach säulenchromatographischer Aufreinigung (C/M 6:1)



$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz, 300 K,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta = 6.45$  (d,  $J = 1.8$  Hz, 1H,  $1\alpha\text{-H}$ ),  $6.36$  (d,  $J = 1.8$  Hz, 1H,  $1\beta\text{-H}$ ),  $5.83$  (dd,  $J = 4.4, 1.5$  Hz, 1H,  $2\beta\text{-H}$ ),  $5.71$  (dd,  $J = 4.5, 1.5$  Hz, 1H,  $2\alpha\text{-H}$ ),  $5.44$  (dd,  $J = 9.7, 4.5$  Hz, 1H,  $3\alpha\text{-H}$ ),  $5.28\text{--}5.20$  (m, 5H,  $5\alpha\text{-}, 6\alpha\text{-}, 6\beta\text{-H}$ ),  $5.06$  (dd,  $J = 9.7, 4.5$  Hz, 1H,  $3\beta\text{-H}$ ),  $4.97$  (t,  $J = 9.6$  Hz, 1H,  $4\alpha\text{-H}$ ),  $4.83$  (t,  $J = 9.4$  Hz, 1H,  $4\beta\text{-H}$ ),  $4.53$  (t,  $J = 3.4$  Hz, 1H,  $5\beta\text{-H}$ ),  $2.88$  (s, 1H,  $9\alpha\text{-H}, 9\beta\text{-H}$ ) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$  (126 MHz, 300 K,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta = 176.70$  (C- $7\alpha$ )  $176.55$  (C- $7\beta$ ),  $95.12$  (C- $1\alpha, -1\beta$ ),  $84.15$  (C-8),  $80.00$  (C- $5\beta$ ),  $77.55$  (C- $3\beta$ ),  $75.25$  (C- $5\alpha$ ),  $73.44$  (C- $3\alpha$ ),  $71.00$  (C- $4\alpha$ ),  $70.96$  (C- $4\beta$ ),  $70.59$  (C-9),  $66.87$  (C- $6\alpha, -6\beta$ ),  $58.94$  (C- $2\beta$ ),  $56.77$  (C- $2\alpha$ ) ppm.

## 2-Acetamido-2-deoxy-D-galactose (18)

Ansatz nach **AAV 1a**

$\text{GalNH}_2\cdot\text{HCl}$ : 1.95 g (9.04 mmol, 1 Äq.)

Acetanhydrid: 1.282 ml (13.56 mmol, 1.5 Äq.)

$\text{NaOMe}$ : 536.9 mg (9.94 mmol, 1.1 Äq.)

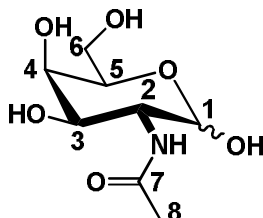
$\text{Et}_3\text{N}$ : 1.25 ml (9.04 mmol, 1 Äq.)

$\text{MeOH}$ : 50 ml

---

$R_f = 0.43$  (C/M, 2:1)

Ausbeute: 1.81 g (90 %) als farbloses Pulver nach Umkristallisation aus (EtOH/Et<sub>2</sub>O 1:1)



<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, 300 K, D<sub>2</sub>O):  $\delta$  = 5.14 (d,  $J$  = 1.5 Hz, 1H, 1 $\alpha$ -H), 5.10 (d,  $J$  = 1.8 Hz, 1H, 1 $\beta$ -H), 4.23 (dd,  $J$  = 8.7 Hz, 1H, 2 $\alpha$ -H), 4.09 (dd,  $J$  = 7.4 Hz, 1H, 2 $\beta$ -H), 3.97 (dd,  $J$  = 9.6, 4.5 Hz, 1H, 3 $\alpha$ -H), 3.85-3.71 (m, 6H, 3 $\beta$ - 5 $\alpha$ -, 6 $\alpha$ -, 6 $\beta$ -H), 3.62 (t,  $J$  = 9.6 Hz, 1H, 4 $\alpha$ -H), 3.56 (t,  $J$  = 9.6 Hz, 1H, 4 $\beta$ -H), 3.50 (dd,  $J$  = 8.7, 4.8 Hz, 1H, 5 $\beta$ -H), 2.56 (s, 3H, 8 $\beta$ -H), 2.55 (s, 3H, 8 $\alpha$ -H) ppm.

<sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, 300 K, D<sub>2</sub>O):  $\delta$  = 172.03 (C-7 $\alpha$ ) 171.95 (C-7 $\beta$ ), 96.88 (C-1 $\alpha$ , -1 $\beta$ ), 76.45 (C-5 $\beta$ ), 73.70 (C-5 $\alpha$ ), 71.66 (C-3 $\beta$ ), 68.44 (C-3 $\alpha$ ), 66.88 (C-4 $\alpha$ ), 66.96 (C-4 $\beta$ ), 62.09 (C-6 $\alpha$ , -6 $\beta$ ), 58.94 (C-2 $\beta$ ), 55.18 (C-2 $\alpha$ ), 34.00 (C-8 $\alpha$ , -8 $\beta$ ) ppm.

### **N-Propanoyl-D-galactosamin (19)**

Ansatz nach **AAV 1a**

GalNH<sub>2</sub>\*HCl: 457.1 mg (2.12 mmol, 1 Äq.)

Propionsäureanhydrid: 407  $\mu$ l (3.19 mmol, 1.5 Äq.)

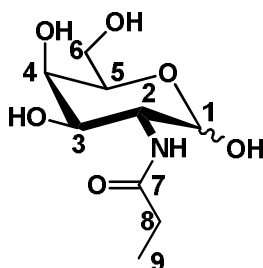
NaOMe: 126.4 mg (2.34 mmol, 1.1 Äq)

Et<sub>3</sub>N: 293.8  $\mu$ l (2.12 mmol, 1 Äq.)

MeOH: 20 ml

$R_f = 0.48$  (C/M, 2:1)

Ausbeute: 365 mg (73 %) als farbloser Feststoff nach säulenchromatographischer Aufreinigung (C/M 2:1)



$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz, 300 K,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  = 5.14 (d,  $J$  = 1.8 Hz, 1H,  $1\alpha\text{-H}$ ), 4.95 (d,  $J$  = 1.8 Hz, 1H,  $1\beta\text{-H}$ ), 4.41 (dd,  $J$  = 4.6, 1.5 Hz, 1H,  $2\alpha\text{-H}$ ), 4.30 (dd,  $J$  = 4.5, 1.5 Hz, 1H,  $2\beta\text{-H}$ ), 4.02 (dd,  $J$  = 9.7, 4.5 Hz, 1H,  $3\alpha\text{-H}$ ), 3.91-3.85 (m, 3H,  $6\beta\text{-H}$ ,  $6\alpha\text{-Ha}$ ), 3.80-3.77 (m, 2H,  $6\alpha\text{-Hb}$ ,  $5\alpha\text{-H}$ ), 3.66 (dd,  $J$  = 9.7, 4.5 Hz, 1H,  $3\beta\text{-H}$ ), 3.61 (t,  $J$  = 9.6 Hz, 1H,  $4\alpha\text{-H}$ ), 3.54 (t,  $J$  = 9.4 Hz, 1H,  $4\beta\text{-H}$ ), 3.33 (t,  $J$  = 3.4 Hz, 1H,  $5\beta\text{-H}$ ), 2.47 (t,  $J$  = 4.5 Hz, 4H,  $8\alpha\text{-}$ ,  $8\beta\text{-H}$ ), 1.58 (q,  $J$  = 7.4 Hz, 6H,  $9\alpha\text{-}$ ,  $9\beta\text{-H}$ ) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$  (126 MHz, 300 K,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  = 176.85 (C-7 $\alpha$ ) 176.10 (C-7 $\beta$ ), 93.55 (C-1 $\alpha$ ), 93.02 (C-1 $\beta$ ), 81.11 (C-5 $\beta$ ), 77.55 (C-3 $\beta$ ), 75.25 (C-5 $\alpha$ ), 73.44 (C-3 $\alpha$ ), 71.00 (C-4 $\alpha$ ), 70.96 (C-4 $\beta$ ), 64.87 (C-6 $\alpha$ , -6 $\beta$ ), 58.94 (C-2 $\beta$ ), 56.77 (C-2 $\alpha$ ), 38.65 (C-8 $\alpha$ ), 38.60 (C-8 $\beta$ ), 29.55 (C-9 $\beta$ , -9 $\alpha$ ) ppm.

## **N-Methoxycarbonyl-D-galactosamin (20)**

Ansatz nach **AAV 1a**

$\text{GalNH}_2\cdot\text{HCl}$ : 454.9 mg (2.11 mmol, 1 Äq.)

Chlormethylformiat: 212.2  $\mu\text{l}$  (2.74 mmol, 1.3 Äq.)

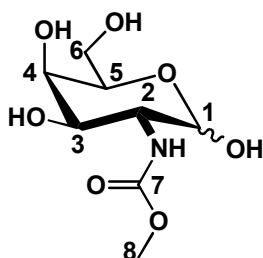
$\text{NaOMe}$ : 125.3 mg (2.32 mmol, 1.1 Äq.)

$\text{Et}_3\text{N}$ : 292.4  $\mu\text{l}$  (2.11 mmol, 1 Äq.)

$\text{MeOH}$ : 20 ml

$R_f = 0.47$  (C/M, 2:1)

Ausbeute: 257.9 mg (52 %) als gelbes Pulver nach säulenchromatographischer Aufreinigung (C/M 2:1)



$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz, 300 K,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta = 5.15$  (d,  $J = 1.5$  Hz, 1H,  $1\alpha\text{-H}$ ),  $5.01$  (d,  $J = 1.8$  Hz, 1H,  $1\beta\text{-H}$ ),  $4.22$  (dd,  $J = 7.4, 4.4$  Hz, 1H,  $2\alpha\text{-H}$ ),  $4.13$  (dd,  $J = 7.8, 2.2$  Hz, 1H,  $2\beta\text{-H}$ ),  $4.02$  (dd,  $J = 9.7, 4.5$  Hz, 1H,  $3\alpha\text{-H}$ ),  $3.86\text{--}3.81$  (m, 5H,  $5\alpha\text{-}$ ,  $6\alpha\text{-}$ ,  $6\beta\text{-H}$ ),  $3.75$  (dd,  $J = 8.7, 4.8$  Hz, 1H,  $3\beta\text{-H}$ ),  $3.72$  (t,  $J = 9.6$  Hz, 1H,  $4\alpha\text{-H}$ ),  $3.61$  (s, 3H, 8-H),  $3.54$  (t,  $J = 9.4$  Hz, 1H,  $4\beta\text{-H}$ ),  $3.41$  (dd,  $J = 9.6$  Hz, 1H,  $5\beta\text{-H}$ ) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$  (126 MHz, 300 K,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta = 172.98$  (C-7 $\alpha$ )  $172.65$  (C-7 $\beta$ ),  $95.36$  (C-1 $\alpha$ ),  $93.82$  (C-1 $\beta$ ),  $78.15$  (C-5 $\beta$ ),  $73.70$  (C-5 $\alpha$ ),  $71.66$  (C-3 $\beta$ ),  $68.44$  (C-3 $\alpha$ ),  $66.88$  (C-4 $\alpha$ ),  $66.96$  (C-4 $\beta$ ),  $63.00$  (C-6 $\alpha$ , -6 $\beta$ ),  $60.94$  (C-2 $\beta$ ),  $58.11$  (C-2 $\alpha$ ),  $47.86$  (C-8) ppm.

### **N-Formyl-D-galactosamin (21)**

Ansatz nach AAV 1a

Synthese unter starker Rückflusskühlung bei RT

$\text{GalNH}_2\cdot\text{HCl}$ : 519.6 mg (2.41 mmol, 1 Äq.)

Ameisensäuremethylester: 7.46 ml (120.5 mmol, 50 Äq.)

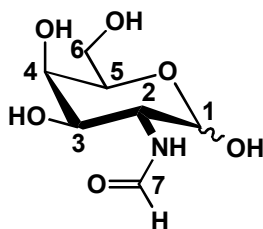
$\text{NaOMe}$ : 143.1 mg (2.65 mmol, 1.1 Äq)

$\text{Et}_3\text{N}$ : 334  $\mu\text{l}$  (2.41 mmol, 1 Äq.)

$\text{MeOH}$ : 15 ml

$R_f = 0.41$  (C/M, 2:1)

Ausbeute: 335.6 mg (67 %) als gelblicher Feststoff



$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz, 300 K,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta = 8.09$  (s, 1H, 7-H), 5.25 (d,  $J = 1.8$  Hz, 1H, 1 $\alpha$ -H), 4.98 (d,  $J = 1.5$  Hz, 1H, 1 $\beta$ -H), 4.49 (dd,  $J = 2.2, 4.8$  Hz, 1H, 2 $\beta$ -H), 4.42 (dd,  $J = 2.2, 4.4$  Hz, 1H, 2 $\alpha$ -H), 4.17 (dd,  $J = 4.4, 8.7$  Hz, 1H, 3 $\alpha$ -H), 3.94-3.86 (m, 3H, 6 $\beta$ -H, 6 $\alpha$ -Ha), 3.81-3.72 (m, 2H, 5 $\alpha$ -H, 6 $\alpha$ -Hb), 3.66 (dd,  $J = 4.4, 9.2$  Hz, 1H, 3 $\beta$ -H), 3.57 (t,  $J = 9.6$  Hz, 1H, 4 $\alpha$ -H), 3.48 (t,  $J = 8.7$  Hz, 1H, 4 $\beta$ -H), 3.33 (t,  $J = 4.4$  Hz, 1H, 5 $\beta$ -H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$  (126 MHz, 300 K,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta = 170.90$  (C-7 $\alpha$ ) 170.35 (C-7 $\beta$ ), 98.50 (C-1 $\alpha$ ), 98.23 (C-1 $\beta$ ), 78.75 (C-5 $\beta$ ), 74.90 (C-3 $\beta$ ), 73.80 (C-5 $\alpha$ ), 71.24 (C-3 $\alpha$ ), 67.88 (C-4 $\alpha$ ), 67.36 (C-4 $\beta$ , C-6 $\alpha$ ), 62.45 (C-6 $\beta$ ), 56.72 (C-2 $\beta$ ), 54.96 (C-2 $\alpha$ ) ppm.

### **N-Propinoyl-D-galactosamin (22)**

Ansatz nach **AAV 1b**

$\text{GalNH}_2 \cdot \text{HCl}$ : 465.7 mg (2.16 mmol, 1 Äq.)

Propionsäure: 200.5  $\mu\text{l}$  (3.24 mmol, 1.5 Äq.)

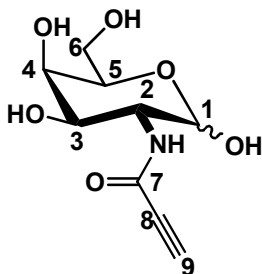
$\text{Et}_3\text{N}$ : 299.4  $\mu\text{l}$  (2.16 mmol, 1 Äq.)

DIC: 401  $\mu\text{l}$  (2.59 mmol, 1.2 Äq.)

DMF\*: 20 ml

$R_f = 0.52$  (C/M, 2:1)

Ausbeute: 340 mg (68 %) als bräunlicher Feststoff nach säulenchromatographischer Aufreinigung (C/M 2:1-C/M 1:4)



$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz, 300 K,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  = 5.27 (d,  $J$  = 1.6 Hz, 1H,  $1\alpha\text{-H}$ ), 5.06 (d,  $J$  = 1.5 Hz, 1H,  $1\beta\text{-H}$ ), 4.87 (dd,  $J$  = 4.7, 1.5 Hz, 1H,  $2\beta\text{-H}$ ), 4.84 (dd,  $J$  = 4.5, 1.8 Hz, 1H,  $2\alpha\text{-H}$ ), 4.66 (dd,  $J$  = 9.4, 4.8 Hz, 1H,  $3\alpha\text{-H}$ ), 4.38-4.20 (m, 5H,  $5\alpha\text{-}$ ,  $6\alpha\text{-}$ ,  $6\beta\text{-H}$ ), 4.16 (dd,  $J$  = 8.7, 4.8 Hz, 1H,  $3\beta\text{-H}$ ), 4.05 (t,  $J$  = 9.6 Hz, 1H,  $4\alpha\text{-H}$ ), 3.91 (t,  $J$  = 9.4 Hz, 1H,  $4\beta\text{-H}$ ), 3.56 (s, 1H,  $9\alpha\text{-H}$ ,  $9\beta\text{-H}$ ), 3.53 (t,  $J$  = 4.8 Hz, 1H,  $5\beta\text{-H}$ ) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$  (126 MHz, 300 K,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  = 173.00 (C-7 $\alpha$ ) 172.94 (C-7 $\beta$ ), 95.12 (C-1 $\alpha$ ), 95.08 (C-1 $\beta$ ), 83.46 (C-8), 79.88 (C-5 $\beta$ ), 78.30 (C-3 $\beta$ ), 75.63 (C-5 $\alpha$ ), 73.14 (C-3 $\alpha$ ), 71.00 (C-4 $\alpha$ ), 70.54 (C-4 $\beta$ ), 69.99 (C-9), 66.87 (C-6 $\alpha$ , -6 $\beta$ ), 54.94 (C-2 $\beta$ ), 52.70 (C-2 $\alpha$ ) ppm.

### **10-[5-(4-(((Z)-4-O-( $\beta$ -D-Lactosyloxy)-but-2-enyloxy)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)pentyl]-acridin-9(10H)-on (23)**

Ansatz nach AAV 4

Lac- $\beta$ -Alkin\*: 297.3 mg (0.66 mmol; 1 Äq.) in 3 ml EtOH

Acr-N<sub>3</sub>\*: 192.9 mg (0.66 mmol; 1 Äq.) in 1.5 ml EtOH

CuSO<sub>4</sub>\*5 H<sub>2</sub>O: 49.4 mg (0.198 mmol, 0.3 Äq.) in 1.5 ml H<sub>2</sub>O

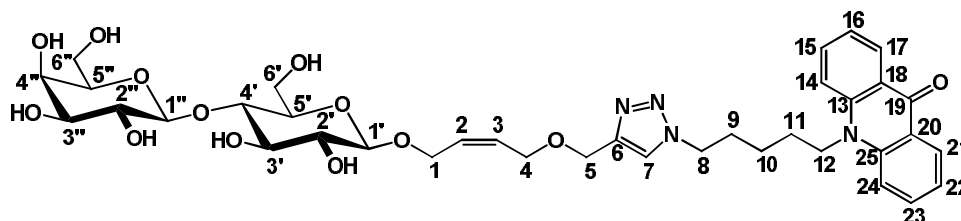
Na-Ascorbat: 65.3 mg (0.33 mmol, 0.5 Äq.) in 1.5 ml H<sub>2</sub>O

Aufreinigung über RP18-Kieselgel (MeOH-Gradient 0-50 %)

$R_f = 0.42$  (C/M, 2:1)

Ausbeute: 398 mg (79 %) als gelbes Pulver

\*Die in der Synthese als Edukte eingesetzten Vorstufen wurden von Fr. Dr. *He* im Rahmen ihrer Arbeit synthetisiert<sup>[1]</sup>.



<sup>1</sup> H-NMR (500 MHz, 300 K, D<sub>2</sub>O):  $\delta$  = 8.50 (dd,  $J$  = 8.0 Hz, 2H; 17-, 21-H), 8.10 (s, 1H, 7-H), 7.90-7.84 (m, 2H, 15-, 23-H), 7.78 (d, 2H, 14-, 24-H), 7.39 (m, 2H, 16-, 22-H), 5.85-5.75 (m, 2H, 2-, 3-H), 4.61 (s, 2H, 5-H), 4.50-4.42 (m, 4H, 8-, 12-H), 4.40-4.38 (m, 1H, 1a-H), 4.38 (d,  $J$  = 7.7 Hz, 1H, 1''-H), 4.38 (d,  $J$  = 7.8 Hz, 1H, 1'-H), 4.33-4.28 (m, 1H, 1b-H), 4.20 (d,  $J$  = 3.0 Hz, 2H, 4-H), 3.90 (d, 1H, 6'a-H), 3.80-3.69 (m, 4H, 6'b-, 6''-, 4''-H), 3.60-3.50 (m, 5H, 5''-, 3''-, 2''-, 4'-, 3'-H), 3.40-3.38 (m, 1H, 5'-H), 3.33-3.29 (m, 1H, 2'-H) 2.10-2.00 (m, 2H, 9-H), 1.94-1.90 (m, 2H, 11-H), 1.60-1.55 (m, 2H, 10-H) ppm.

<sup>13</sup> C-NMR (126 MHz, 300 K, D<sub>2</sub>O):  $\delta$  = 178.35 (C-19), 143.50 (C-6), 136.2 (C-15, -23), 131.56 (C-2, -3), 128.04 (C-17, -21), 123.94 (C-13, -25), 123.20 (C-16, -22), 118.00 (C-14, -24), 105.60 (C-1''), 103.3 (C-1'), 81.76 (C-4'), 77.85 (C-3''), 76.90 (C-5''), 75.35 (C-3'), 75.10 (C-2'), 72.88 (C-2''), 71.65 (C-4'') 67.10 (C-4), 65.99 (C-1), 64.87 (C-5), 62.90 (C-6''), 61.21 (C-6'), 51.55 (C-8), 48.30 (C-12), 31.00 (C-9), 28.20 (C-11), 25.05 (C-10) ppm.

---

## 5-*epi*-N-Acetyl-D-neuraminsäure (24)

Ansätze nach AAV 5a

### Synthesen mit der Pseudaminsäuresynthase $\text{PseS}_{Cje}$

#### Ansatz I

GlcNAc (**10**): 1.0 g (4.52 mmol, 1 Äq.)

PEP (**1**) (1M): 4.96 ml (4.97 mmol, 1.1 Äq.)

$\text{PseS}_{Cje}$  ohne N-terminales  $\text{His}_{(6-10)}$ -Tag: 100 mg

Tris-Puffer (50 mM, pH= 8.0): 4914  $\mu\text{l}$

50 mM  $\text{MgCl}_2$  (2M): 126  $\mu\text{l}$

$R_f = 0.25$  (n-BuOH/Aceton/AcOH/ $\text{H}_2\text{O}$ , 35:35:7:23)

Ausbeute: 52 mg (5 %) als rotbrauner Feststoff nach mehreren säulenchromatographischen Aufreinigungsschritten (Bio-Gel P2, Anionen-, Kationentauscher)

#### Ansatz II

GlcNAc (**10**): 500 mg (2.26 mmol, 1 Äq.)

PEP (**1**) (1M): 2.58 ml (2.50 mmol, 1.1 Äq.)

$\text{PseS}_{Cje}$  mit N-terminales  $\text{His}_{(6-10)}$ -Tag: 100 mg

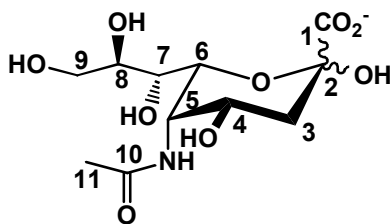
Bicin-Puffer (50 mM, pH= 8.0): 7234.5  $\mu\text{l}$

50 mM  $\text{MnCl}_2$  (2M): 185.5  $\mu\text{l}$

$R_f = 0.28$  (n-BuOH/Aceton/AcOH/ $\text{H}_2\text{O}$ , 35:35:7:23)

Ausbeute: 94 mg (12.5 %) als beiger Feststoff nach mehreren säulenchromatographischen Aufreinigungsschritten (Anionen-, Kationentauscher)





$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz, 300 K,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  = 3.94-3.81 (m, 2H, 4-, 6-H), 3.73 (dd,  $J$  = 4.8, 2.2 Hz, 1H, 5-H), 3.55 (dd,  $J$  = 9.4, 4.8 Hz, 1H, 9-Ha), 3.48-3.42 (m, 1H, 8-H), 3.34 (dd,  $J$  = 9.7, 4.5 Hz, 1H, 9-Hb), 3.27 (d,  $J$  = 9.2 Hz, 1H, 7-H), 2.48 (dd,  $J$  = 9.6, 4.8 Hz, 1H, 3-Ha), 2.05 (s, 3H, 11-H), 1.65 (t,  $J$  = 9.6, 11.6 Hz, 1H, 3-Hb) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$  (126 MHz, 300 K,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  = 176.22 (C-1) 172.66 (C-10), 95.69 (C-2), 70.58 (C-6, C-8), 68.55 (C-7), 66.84 (C-4), 63.52 (C-9), 52.15 (C-5), 36.26 (C-3), 23.38 (C-11) ppm.

### Synthese mit der *N*-Acetylneuraminsäuresynthase NeuS<sub>Nme</sub>

Ansatz nach AAV 5a

GlcNAc (**10**): 200 mg (0.904 mmol, 1 Äq.)

PEP (**1**) (1M): 1.0 ml (1.0 mmol, 1.1 Äq.)

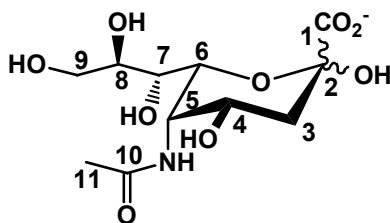
NeuS<sub>Nme</sub>: 60 mg

Bicin-Puffer (50 mM, pH= 8.0): 3960  $\mu\text{l}$

20 mM  $\text{MnCl}_2$  (2M): 40  $\mu\text{l}$

$R_f$  = 0.25 (n-BuOH/Aceton/AcOH/ $\text{H}_2\text{O}$ , 35:35:7:23)

Ausbeute: 18 mg (9 %) als farbloser Feststoff



---

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, 300 K, D<sub>2</sub>O):  $\delta$  = 3.98-3.90 (m, 1H, 4-H), 3.88 (dd,  $J$  = 9.9, 2.2 Hz, 1H, 6-H), 3.84-3.77 (m, 2H, 9-Ha, 7-H), 3.70 (m, 1H, 8-H), 3.60 (dd,  $J$  = 11.8, 6.5 Hz, 1H, 9-Hb), 3.52 (t,  $J$  = 9.2 Hz, 1H, 5-H), 2.48 (dd,  $J$  = 9.6, 4.8 Hz, 1H, 3-Ha), 2.15 (s, 3H, 11-H), 1.74 (dd,  $J$  = 9.6, 11.6 Hz, 1H, 3-Hb) ppm.

<sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, 300 K, D<sub>2</sub>O):  $\delta$  = 175.42 (C-1) 170.74 (C-10), 95.95 (C-2), 70.58 (C-6, C-8), 68.55 (C-7), 66.84 (C-4), 63.52 (C-9), 52.50 (C-5), 36.89 (C-3), 23.52 (C-11) ppm.

### 5,7-*bisepi*-N-Acetyl-D-neuraminsäure (25)

Ansätze nach AAV 5a

Ansatz I

GalNAc (**18**): 500 mg (2.26 mmol, 1 Äq.)

PEP (**1**) (1M): 2.58 ml (2.51 mmol, 1.1 Äq.)

PseS<sub>Cje</sub> ohne N-terminales His<sub>(6-10)</sub>-Tag: 100 mg

Tris-Puffer (50 mM, pH= 8.0): 4914  $\mu$ l

50 mM MgCl<sub>2</sub> (2M): 126  $\mu$ l

R<sub>f</sub> = 0.29 (n-BuOH/Aceton/AcOH/H<sub>2</sub>O, 35:35:7:23)

Ausbeute: 45 mg (6%) als rotbrauner hygroskopischer Feststoff

Ansatz II

GalNAc (**18**): 500 mg (2.26 mmol, 1 Äq.)

PEP (**1**) (1M): 2.58 ml (2.50 mmol, 1.1 Äq.)

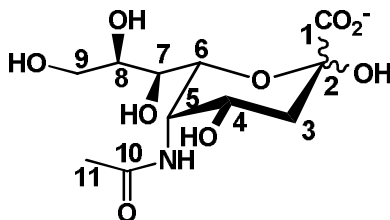
PseS<sub>Cje</sub> mit N-terminales His<sub>(6-10)</sub>-Tag: 100 mg

Bicin-Puffer (50 mM, pH= 8.0): 7234.5  $\mu$ l

50 mM MnCl<sub>2</sub> (2M): 185.5  $\mu$ l

$R_f = 0.31$  (n-BuOH/Aceton/AcOH/H<sub>2</sub>O, 35:35:7:23)

Ausbeute: 61.5 mg (8,2 %) als gelblicher ebenfalls hygroskopischer Feststoff/Öl



<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, 300 K, D<sub>2</sub>O):  $\delta$  = 3.97-3.89 (m, 2H, 4-, 6-H), 3.84 (dd,  $J$  = 4.4, 1.5 Hz, 1H, 5-H), 3.75 (dd,  $J$  = 11.9, 2.6 Hz, 1H, 9-Ha), 3.68 (ddd,  $J$  = 9.7, 4.5 Hz, 1H, 8-H), 3.53 (dd,  $J$  = 11.8, 4.9 Hz, 1H, 9-Hb), 3.43 (d,  $J$  = 9.2, 1.1 Hz, 1H, 7-H), 2.36 (dd,  $J$  = 9.6, 4.8 Hz, 1H, 3-Ha), 1.90-1.75 (m, 4H, 3-Hb, 11-H) ppm.

<sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, 300 K, D<sub>2</sub>O):  $\delta$  = 178.12 (C-1, -10), 96.80 (C-2), 70.88 (C-8), 70.56 (C-6), 69.33 (C-7), 67.14 (C-4), 63.75 (C-9), 53.27 (C-5), 39.91 (C-3), 28.81 (C-11) ppm.

### 5-*epi*-N-Methoxycarbonyl-D-neuraminsäure (26)

#### Synthese mit der Pseudaminsäuresynthase PseS<sub>Cje</sub>

Ansatz nach AAV 5a

GlcNMethoxycarbonyl (**13**): 240 mg (1.01 mmol, 1 Äq.)

PEP (**1**) (1M): 1.0 ml (1.21 mmol, 1.1 Äq.)

PseS<sub>Cje</sub>: 40 mg

Bicin-Puffer (50 mM, pH= 8.0): 3995  $\mu$ l

20 mM MnCl<sub>2</sub> (2M): 50  $\mu$ l

$R_f = 0.38$  (n-BuOH/Aceton/AcOH/H<sub>2</sub>O, 35:35:7:23)

Ausbeute: 27 mg (7.7%) als farbloser Feststoff

### Synthese mit der *N*-Acetylneuraminsäuresynthase NeuS<sub>Nme</sub>

Ansatz nach AAV 5a

GlcNMethoxycarbonyl (**13**): 200 mg (0.784 mmol, 1 Äq.)

PEP (**1**) (1M): 0.75 ml (0,862 mmol, 1.1 Äq.)

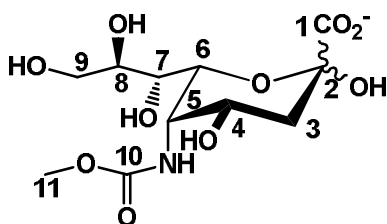
NeuS<sub>Nme</sub>: 20 mg

Bicin-Puffer (50 mM, pH= 8.0): 4.2 ml

10 mM MnCl<sub>2</sub> (2M): 50 µl

R<sub>f</sub> = 0.40 (n-BuOH/Aceton/AcOH/H<sub>2</sub>O, 35:35:7:23)

Ausbeute: 10 mg (4 %) als farbloser Feststoff



<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, 300 K, D<sub>2</sub>O):  $\delta$  = 4.03-3.95 (m, 2H, 4-, 6-H), 3.89-3.81 (m, 2H, 5-, 8-H), 3.69 (d,  $J$  = 2.6 Hz, 1H, 9-Ha), 3.63 (s, 3H, 11-H), 3.56 (d,  $J$  = 9.2, 1.1 Hz, 1H, 7-H), 3.53 (dd,  $J$  = 11.8, 4.9 Hz, 1H, 9-Hb), 2.16 (dd,  $J$  = 13.0, 4.8 Hz, 1H, 3-Ha), 1.87 (t,  $J$  = 11.8 Hz, 1H, 3-Hb) ppm.

<sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, 300 K, D<sub>2</sub>O):  $\delta$  = 176.25 (C-1), 174.77 (C-10), 96.00 (C-2), 69.65 (C-6), 68.70 (C-5), 68.59 (C-7), 66.78 (C-4), 63.75 (C-9), 51.97 (C-8), 48.88 (C-11), 39.91 (C-3) ppm.

## N-Chloracetyl-D-neuraminsäure (27)

Ansätze I und II nach **AAV 5a**

Ansatz I

ManNAcCl (**6**): 200 mg (0.784 mmol, 1 Äq.)

PEP (**1**) (1M): 706 µl (0.862 mmol, 1.1 Äq.)

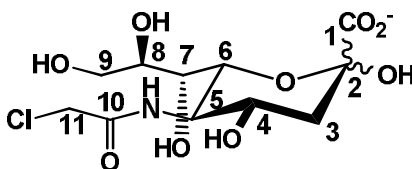
NeuS<sub>Nme</sub>: 50 mg

Bicin-Puffer (50 mM, pH= 8.0): 4269 µl

10 mM MnCl<sub>2</sub> (2M): 25 µl

R<sub>f</sub> = 0.37 (n-BuOH/Aceton/AcOH/H<sub>2</sub>O, 35:35:7:23)

Ausbeute: 38 mg (14.2 %) als farbloser Feststoff nach Isolierung des Produktes aus der säulenchromatographischen Aufreinigung.



<sup>1</sup> H-NMR (500 MHz, 300 K, D<sub>2</sub>O): δ = 4.27 (s, 2H, 11-H), 4.01-3.97 (m, 1H, 4-H), 3.88 (dd, *J* = 9.9, 2.2 Hz, 1H, 6-H), 3.84-3.77 (m, 2H, 9-Ha, 7-H), 3.70 (m, 1H, 8-H), 3.60 (dd, *J* = 11.8, 6.5 Hz, 1H, 9-Hb), 3.52 (t, *J* = 9.2 Hz, 1H, 5-H), 2.48 (dd, *J* = 9.6, 4.8 Hz, 1H, 3-Ha), 2.15 (dd, *J* = 9.6, 11.6 Hz, 1H, 3-Hb) ppm.

<sup>13</sup> C-NMR (126 MHz, 300 K, D<sub>2</sub>O): δ = 175.42 (C-1) 170.74 (C-10), 95.95 (C-2), 70.58 (C-6, C-8), 68.55 (C-7), 66.84 (C-4), 63.52 (C-9), 52.50 (C-5), 43.55 (C-11) 36.89 (C-3), 23.52 (C-11) ppm.

Ansatz II

ManNAcCl (**6**): 50 mg (0.196 mmol, 1 Äq.)

---

PEP (**1**) (1M): 177  $\mu$ l (0.220 mmol, 1.1 Äq.)

NeuS<sub>Cje</sub>: 20 mg

Bicin-Puffer (50 mM, pH= 8.0): 4798  $\mu$ l

10 mM MnCl<sub>2</sub> (2M): 25  $\mu$ l

R<sub>f</sub> = 0.35 (n-BuOH/Aceton/AcOH/H<sub>2</sub>O, 35:35:7:23)

Keine Produktisolierung aufgrund des kleinen Ansatzes. Produktbildung via DC detektiert.

Ansätze III und IV nach **AAV 5b** <sup>[Seb]</sup>

Ansatz III

GlcNAcCl (**15**): 574 mg ( 2.25 mmol, 1 Äq.)

PEP (**1**) (1M): 2.5 ml ( 2.50 mmol, 1.1 Äq.)

AGE<sub>Ava</sub>: 6  $\mu$ l/ml

NeuS<sub>Nme</sub>: 0.01 mg/ml

Bicin-Puffer (50 mM, pH= 8.0): 22.16 ml

10 mM MnCl<sub>2</sub> (2M): 125  $\mu$ l

0.25 mM ATP (0.1 M): 62.5  $\mu$ l

R<sub>f</sub> = 0.29 (n-BuOH/Aceton/AcOH/H<sub>2</sub>O, 35:35:7:23)

Ausbeute: 254 mg (33 %) als farbloser Feststoff nach mehreren säulenchromatographischen Aufreinigungsschritten.

Ansatz IV

GlcNAcCl (**15**): 574 mg ( 2.25 mmol, 1 Äq.)

PEP (**1**) (1M): 2.5 ml ( 2.50 mmol, 1.1 Äq.)

AGE<sub>Ava</sub>: 6  $\mu$ l/ml

NeuS<sub>Cje</sub>: 0.02 mg/ml

Bicin-Puffer (50 mM, pH= 8.0): 21.66 ml

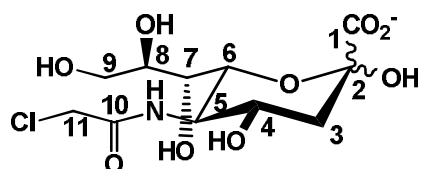
50 mM MnCl<sub>2</sub> (2M): 625  $\mu$ l

---

0.25 mM ATP (0.1 M): 62.5  $\mu$ l

$R_f = 0.29$  (n-BuOH/Aceton/AcOH/H<sub>2</sub>O, 35:35:7:23)

Ausbeute: 220 mg (28.5 %) als farbloser Feststoff nach mehreren säulenchromatographischen Aufreinigungsschritten (Bio-Gel P2, Anionen-, Kationentauscher)



<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, 300 K, D<sub>2</sub>O):  $\delta$  = 4.21 (s, 2H, 11-H), 4.03-3.92 (m, 2H, 4-, 6-H), 3.88 (t,  $J$  = 10.4 Hz, 1H, 5-H), 3.78 (dd,  $J$  = 11.9, 2.6 Hz, 1H, 9-Ha), 3.71 (ddd,  $J$  = 8.9, 6.0, 2.7 Hz, 1H, 8-H), 3.58 (dd,  $J$  = 11.8, 6.0 Hz, 1H, 9-Hb), 3.46 (d,  $J$  = 9.1, 1.0 Hz, 1H, 7-H), 2.17 (dd,  $J$  = 10.7, 5.1 Hz, 1H, 3-Ha), 1.78 (dd,  $J$  = 9.7, 4.5 Hz, 1H, 3-Hb) ppm.

<sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, 300 K, D<sub>2</sub>O):  $\delta$  = 181.89 (C-1), 176.66 (C-10), 96.80 (C-2), 70.64 (C-6, -8), 68.96 (C-7), 67.59 (C-4), 63.57 (C-9), 52.65 (C-5), 43.40 (C-11), 39.95 (C-3) ppm.

### 5-*epi*-N-Chloroacetyl-D-neuraminsäure (28)

Ansätze I und II nach **AAV 5a**

Ansatz I

GlnNAcCl (**15**): 40 mg (0,157 mmol, 1 Äq.)

PEP (**1**) (1M): 1.75  $\mu$ l (0.173 mmol, 1.1 Äq.)

NeuS<sub>Ne</sub>: 20 mg

Bicin-Puffer (50 mM, pH= 8.0): 1491  $\mu$ l

10 mM MnCl<sub>2</sub> (2M): 7.5  $\mu$ l

---

$R_f = 0.38$  (n-BuOH/Aceton/AcOH/H<sub>2</sub>O, 35:35:7:23)

Keine Produktisolierung aufgrund des kleinen Ansatzes. Produktbildung via DC detektiert.

#### Ansatz II

GlnNAcCl (**15**): 40 mg (0,157 mmol, 1 Äq.)

PEP (**1**) (1M): 1.75 µl (0.173 mmol, 1.1 Äq.)

NeuS<sub>Cje</sub>: 40 mg

Bicin-Puffer (50 mM, pH= 8.0): 1461 µl

50 mM MnCl<sub>2</sub> (2M): 37.5 µl

$R_f = 0.35$  (n-BuOH/Aceton/AcOH/H<sub>2</sub>O, 35:35:7:23)

Keine Produktisolierung aufgrund des kleinen Ansatzes. Produktbildung via DC detektiert.

### **N-Methoxycarbonyl-D-neuraminsäure (29)**

Ansätze I und II nach **AAV 5a**

#### Ansatz I

ManNUre (**5**): 150 mg (0.632 mmol, 1 Äq.)

PEP (**1**) (1M): 698 µl (0.695 mmol, 1.1 Äq.)

NeuS<sub>Nme</sub>: 30 mg

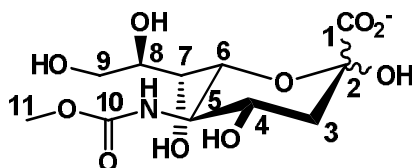
Bicin-Puffer (50 mM, pH= 8.0): 4277 µl

10 mM MnCl<sub>2</sub> (2M): 25 µl

$R_f = 0.33$  (n-BuOH/Aceton/AcOH/H<sub>2</sub>O, 35:35:7:23)



Ausbeute: 24 mg (11.7 %) als farbloser Feststoff nach mehreren säulenchromatographischen Aufreinigungsschritten (Anionen-, Kationentauscher).



<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, 300 K, D<sub>2</sub>O):  $\delta$  = 4.01-3.94 (m, 1H, 4-H), 3.88 (dd,  $J$  = 9.9, 2.2 Hz, 1H, 6-H), 3.82-3.75 (m, 2H, 9-Ha, 7-H), 3.70 (m, 1H, 8-H), 3.67 (s, 3H, 11-H), 3.63 (dd,  $J$  = 11.8, 6.5 Hz, 1H, 9-Hb), 3.52 (t,  $J$  = 9.2 Hz, 1H, 5-H), 2.48 (dd,  $J$  = 9.6, 4.8 Hz, 1H, 3-Ha), 1.84 (dd,  $J$  = 9.6, 11.6 Hz, 1H, 3-Hb) ppm.

<sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, 300 K, D<sub>2</sub>O):  $\delta$  = 175.42 (C-1) 170.74 (C-10), 95.95 (C-2), 70.58 (C-6, C-8), 68.55 (C-7), 66.84 (C-4), 63.52 (C-9), 52.50 (C-5), 46.93 (C-11), 36.73 (C-3) ppm.

## Ansatz II

ManNUre (**5**): 50 mg (0.210 mmol, 1 Äq.)

PEP (**1**) (1M): 231  $\mu$ l (0.231 mmol, 1.1 Äq.)

NeuS<sub>Cje</sub>: 20 mg

Bicin-Puffer (50 mM, pH= 8.0): 744  $\mu$ l

50 mM MnCl<sub>2</sub> (2M): 25  $\mu$ l

$R_f$  = 0.32 (n-BuOH/Aceton/AcOH/H<sub>2</sub>O, 35:35:7:23)

Keine Produktisolierung aufgrund des kleinen Ansatzes. Produktbildung via DC detektiert.

Ansätze III und IV nach **AAV 5b** <sup>[Sebl]</sup>

## Ansatz III

GlcNUre (**13**): 426.7 mg (1.79 mmol, 1 Äq.)

---

PEP (**1**) (1M): 2.0 ml (1.97 mmol, 1.1 Äq.)

AGE<sub>Ava</sub>: 6 µl/ml

NeuS<sub>Nme</sub>: 0.01 mg/ml

Bicin-Puffer (50 mM, pH= 8.0): 17.985 ml

10 mM MnCl<sub>2</sub> (2M): 100 µl

0.25 mM ATP (0.1 M): 50 µl

R<sub>f</sub> = 0.28 (n-BuOH/Aceton/AcOH/H<sub>2</sub>O, 35:35:7:23)

Ausbeute: 70.2 mg (12 %) als farbloser Feststoff nach mehreren säulenchromatographischen Aufreinigungsschritten.

#### Ansatz IV

GlcNUre (**13**): 426.7 mg (1.79 mmol, 1 Äq.)

PEP (**1**) (1M): 2.0 ml (1.97 mmol, 1.1 Äq.)

AGE<sub>Ava</sub>: 6 µl/ml

NeuS<sub>Cje</sub>: 0.02 mg/ml

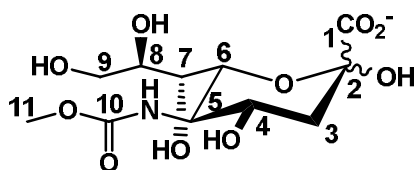
Bicin-Puffer (50 mM, pH= 8.0): 17.45 ml

50 mM MnCl<sub>2</sub> (2M): 500 µl

0.25 mM ATP (0.1 M): 50 µl

R<sub>f</sub> = 0.28 (n-BuOH/Aceton/AcOH/H<sub>2</sub>O, 35:35:7:23)

Ausbeute: 115 mg (20 %) als farbloser Feststoff nach mehreren säulenchromatographischen Aufreinigungsschritten (Bio-Gel P2, Anionen-, Kationentauscher)



<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, 300 K, D<sub>2</sub>O): δ = 3.81-3.75 (m, 2H, 4-, 6-H), 3.72-3.70 (m, 1H, 5-H), 3.60 (s, 3H, 11-H), 3.56 (dd, *J* = 10.7, 2.6 Hz, 1H, 9-Ha), 3.49-3.46 (m, 1H, 8-H), 3.42 (dd, *J* = 11.8, 6.0 Hz, 1H, 9-Hb), 3.35 (d, *J* = 9.1, 1.0 Hz, 1H, 7-H), 1.95 (dd, *J* = 12.9, 4.8 Hz, 1H, 3-Ha), 1.78 (dd, *J* = 9.7, 11.6 Hz, 1H, 3-Hb) ppm.

<sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, 300 K, D<sub>2</sub>O): δ = 175.08 (C-1), 174.94 (C -10), 96.35 (C-2), 71.64 (C-6), 70.12 (C -8), 68.85 (C-7), 67.60 (C-4), 63.63 (C-9), 52.65 (C-5), 48.88 (C-11), 39.95 (C-3) ppm.

### **N-Glykolyl-D-neuraminsäure (30)**

Ansatz nach **AAV 5a**

ManNGlykolyl (**19**): 500 mg (0.210 mmol, 1 Äq.)

PEP (**1**) (1M): 1.183 ml (0.252 mmol, 1.2 Äq.)

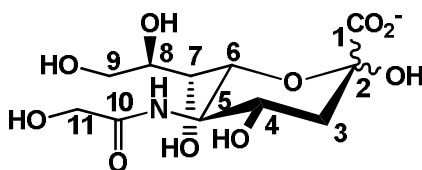
NeuS<sub>Nme</sub>: 10 mg

Bicin-Puffer (50 mM, pH= 8.0): 3792 µl

10 mM MnCl<sub>2</sub> (2M): 25 µl

R<sub>f</sub> = 0.25 (n-BuOH/Aceton/AcOH/H<sub>2</sub>O, 35:35:7:23)

Ausbeute: Isolierung des Produktes in reiner sauberer Form gelang nicht, von Fr. Vethaseelan konnten im Rahmen ihrer Arbeit 100 mg verunreinigtes Produkt (**30**) nach mehreren säulenchromatographischen Schritten (Bio-Gel P2, Anionen-, Kationentauscher) isoliert werden. Eine genaue Zuordnung aller zum Produkt gehörender Peaks in den NMR-Spektren war nicht möglich.



---

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, 300 K, D<sub>2</sub>O):  $\delta$  = 3.98-3.85 (m, 4H, 4-, 6-, 11-H), 3.70 (t,  $J$  = 10.7 Hz 1H, 5-H), 3.58 (dd,  $J$  = 10.3, 2.6 Hz, 1H, 9-Ha), 3.49-3.46 (m, 1H, 8-H), 3.42 (dd,  $J$  = 11.4, 6.2 Hz, 1H, 9-Hb), 3.30 (d,  $J$  = 9.1 Hz, 1H, 7-H), 2.10 (dd,  $J$  = 13.1, 4.8 Hz, 1H, 3-Ha), 1.84 (dd,  $J$  = 13.1, 11.6 Hz, 1H, 3-Hb) ppm.

<sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, 300 K, D<sub>2</sub>O):  $\delta$  = 176.08 (C-1), 173.49 (C -10), 96.57 (C-2), 70.64 (C-6), 70.42 (C -8), 68.85 (C-7), 64.36 (C-4), 63.53 (C-9), 52.65 (C-5), 48.88 (C-11), 39.05 (C-3) ppm.

**10-[5-(4-(((Z)-4-O-((5-*epi*-N-Acetyl- $\alpha$ -D-neuraminsäure)-(2 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-lactosyloxy)-but-2-enyloxy)methyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)pentyl]-10*H*-acridon-9-on (31)**

Ansatz nach AAV 6

5-*epi*-Neu5Ac (**24**): 34.6 mg (0.104 mmol, 4 Äq.)

CTP: 60.4 mg (0.125 mmol, 4.8 Äq.)

anorganische Pyrophosphatase: 10  $\mu$ l

CSS<sub>Nme</sub>: 60 mg

Lac-D-T-P-Acr (**23**): 20 mg (0.026 mmol, 1 Äq.)

Alkalische Phosphatase: 5  $\mu$ l

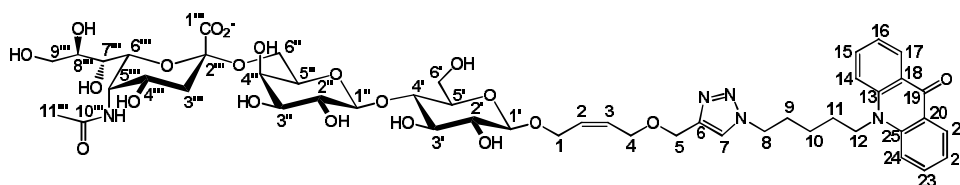
$\alpha$ -2,6-SiaT<sub>Plc</sub>: 30  $\mu$ l

Tris-Puffer (50 mM, pH 8.5 + 50 mM MgCl<sub>2</sub>): 3 ml

$R_f$ (CMP-5-*epi*-Neu5Ac) = 0.22 (n-Propanol/H<sub>2</sub>O/NH<sub>3</sub> 8:2:1)

$R_f$ (5-*epi*-Neu5Ac- $\alpha$ (2,6)-Lac-D-T-P-Acr) = 0.44 (n-BuOH/Aceton/AcOH/H<sub>2</sub>O, 40:40:5:15)

Ausbeute: 2.0 mg (7.4 %) farbloser Feststoff nach säulenchromatographischer Aufreinigung (RP<sub>18</sub>-Kieselgel, MeOH 0-40 %)



<sup>1</sup> H-NMR (500 MHz, 300 K, D<sub>2</sub>O):  $\delta$  = 8.20 (dd,  $J$  = 11.8, 1.5 Hz, 2H, 21-, 17-H), 7.85 (s, 1H, 7-H), 7.71 (t, 2H, 23-, 15-H), 7.48-7.44 (m, 2H, 24-, 14-H), 7.29-7.23 (m, 2H, 22-, 16-H), 5.60-5.52 (m, 2H, 3-, 2-H), 4.48 (s, 2H, 5-H), 4.32-4.24 (m, 4H, 1'-, 1''-, 5'''-H), 4.11 – 4.06 (m, 3H, 8-, 1-Ha), 3.99 (dd, 1H, 1-Hb), 3.95 (dd,  $J$  = 3.1, 9.9 Hz, 1H, 3''-H), 3.83 (d,  $J$  = 6.0 Hz, 2H, 4-H), 3.81 (d,  $J$  = 3.1 Hz, 1H, 4'-H), 3.75 – 3.68 (m, 4H, 6'-Ha, 9'''-Ha, 6'''-, 5'''-H), 3.61 – 3.35 (m, 13H, 8-, 6'-Hb, 4'-, 3'-, 6'''-, 5'''-, 2''-H, 9'''-Hb, 8'''-, 7'''-, 4'''-H), 3.24-3.21 (m, 1H, 5'-H), 3.10 (dd,  $J$  = 8.1, 9.1 Hz, 1H, 2'-H), 2.50-2.48 (dd,  $J$  = 12.5, 4.6 Hz, 1H, 3'''-Ha), 2.0 (s, 3H, 11'''-H), 1.82-1.76 (m, 2H, 9-H), 1.70 (t,  $J$  = 12.0 Hz, 1H, 3'''-Hb), 1.53-1.48 (m, 2H, 12-H), 1.30-1.25 (m, 4H, 11-, 10-H) ppm.

<sup>13</sup> C-NMR (126 MHz, 300 K, D<sub>2</sub>O):  $\delta$  = 178.08 (C-19), 175.34 (C-1'''), 174.94 (C-10'''), 146.27 (C-6), 141.01 (C-25, -13), 137.43 (C-23, -15), 130.90 (C-3; -2), 128.15 (C-21, -17), 125.87 (C-7), 122.10 (C-22, -16), 120.87 (C-20, -18), 117.50 (C-24, -14), 104.03 (C-1'), 102.20 (C-1'), 97.99 (C-2'''), 80.15 (C-4'), 77.33 (C-3'''), 76.67 (C-8'''), 75.89 (C-5'''), 75.23 (C-5'), 74.47 (C-3'), 74.38 (C-2'), 73.54 (C-6'''), 70.24 (C-7'''), 69.96 (C-2''), 69.33 (C-4'''), 68.71 (C-4''), 66.78 (C-4), 66.56 (C-1), 63.50 (C-9'''), 61.99 (C-6''), 61.17 (C-5), 60.98 (C-6'), 51.64 (C-5'''), 51.02 (C-8), 46.17 (C-12), 36.75 (C-3'''), 29.44 (C-9, C-12), 26.78 (C-11), 22.95 (C-10), 22.86 (C-11''') ppm.

**10-[5-(4-(((Z)-4-O-((5,7-bisepi-N-Acetyl- $\alpha$ -D-neuraminsäure)-(2 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-lactosyloxy)-but-2-enyloxy)methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)pentyl]-10H-acridon-9-one (32)**

Ansatz nach AAV 6

5,7-bisepi-Neu5Ac (25): 34.6 mg (0.104 mmol, 4 Äq.)

CTP: 60.4 mg (0.125 mmol, 4.8 Äq.)

anorganische Pyrophosphatase: 10 µl

CSS<sub>Nme</sub>: 60 mg

Lac-D-T-P-Acr (**23**): 20 mg (0.026 mmol, 1 Äq.)

Alkalische Phosphatase: 5 µl

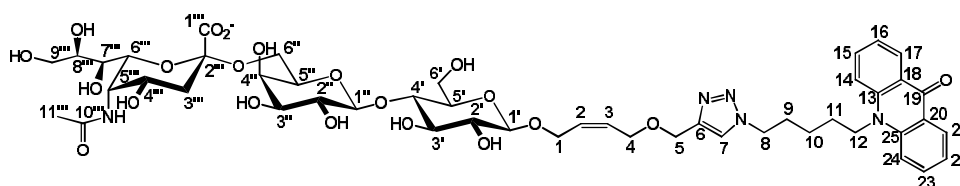
α-2,6-SiaT<sub>Plc</sub>: 30 µl

Tris-Puffer (50 mM, pH 8.5 + 50 mM MgCl<sub>2</sub>): 3 ml

R<sub>f</sub>(CMP-5,7-*bisepi*-Neu5Ac) = 0.20 (n-Propanol/H<sub>2</sub>O/NH<sub>3</sub> 8:2:1)

R<sub>f</sub>(5,7-*bisepi*-Neu5Ac-α(2,6)-Lac-D-T-P-Acr) = 0.39 (n-BuOH/Aceton/AcOH/H<sub>2</sub>O,  
40:40:5:15)

Ausbeute: 1.5 mg (5.5 %) farbloser Feststoff nach säulenchromatographischer Aufreinigung  
(RP18-Kieselgel, MeOH 0-40 %)



<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, 300 K, D<sub>2</sub>O): δ = 7.68 (dd, *J* = 11.8, 1.5 Hz, 2H, 21-, 17-H), 7.63 (s, 1H, 7-H), 7.22-7.19 (m, 2H, 23-, 15-H), 6.82-7.74 (m, 4H, 24-, 22-, 16-, 14-H), 5.56-5.52 (m, 2H, 3-, 2-H), 4.35 (s, 2H, 5-H), 4.32-4.24 (m, 4H, 1'-, 1''-, 5'''-H), 4.11 – 4.06 (m, 3H, 8-, 1-Ha), 4.02 (dd, *J* = 3.1, 9.9 Hz, 1H, 1-Hb), 3.95 (dd, *J* = 3.1, 9.9 Hz, 1H, 3''-H), 3.89 (d, *J* = 6.0 Hz, 2H, 4-H), 3.84 (d, *J* = 3.1 Hz, 1H, 4''-H), 3.75 – 3.68 (m, 4H, 6'-Ha, 9'''-Ha, 6'''-, 5'''-H), 3.61 – 3.35 (m, 13H, 8-, 6'-Hb, 4'-, 3'-, 6''-, 5''-, 2''-H, 9'''-Hb, 8'''-, 7'''-, 4'''-H), 3.24-3.21 (m, 1H, 5'-H), 3.10 (dd, *J* = 8.1, 9.1 Hz, 1H, 2'-H), 2.50-2.48 (dd, *J* = 12.5, 4.6 Hz, 1H, 3'''-Ha), 2.0 (s, 3H, 11'''-H), 1.82-1.76 (m, 2H, 9-H), 1.70 (t, *J* = 12.0 Hz, 1H, 3'''-Hb), 1.62-1.51 (m, 2H, 12-H), 1.35-1.29 (m, 4H, 11-, 10-H) ppm.

<sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, D<sub>2</sub>O): δ = 178.38 (C-19), 175.39 (C-1'''), 174.28 (C-10'''), 144.15 (C-6), 140.89 (C-13, -25), 134.87 (C-15, -23), 129.60 (C-2), 129.35 (C-3), 126.54 (C-17, -21), 124.97 (C-7), 121.95 (C-16, -22), 120.68 (C-18, -20), 115.30 (C-14, -24), 103.09 (C-1'), 101.43 (C-1'), 100.18 (C-2'''), 78.65 (C-4'), 75.89 (C-3''), 75.50 (C-8'''), 75.10 (C-5'),

74.76 (C-5'), 73.27 (C-3'), 73.04 (C-2'), 72.12 (C-6''), 69.72 (C-2''), 68.69 (C-7'''), 68.47 (C-4'''), 67.84 (C-4'), 65.44 (C-4), 65.03 (C-1), 62.96 (C-9'''), 62.66 (C-5), 61.38 (C-6'), 60.37 (C-6''), 52.11 (C-5'''), 50.38 (C-8), 45.56 (C-12), 40.02 (C-3'''), 29.14 (C-9), 28.99 (C-12), 26.06 (C-11), 22.95 (C-10), 22.42 (C-11''') ppm.

### 5,7-bisepi-*N*-Methoxycarbonyl-D-neuraminsäure (94)

Ansatz nach AAV 5a

GalNMethoxycarbonyl (**20**): 240 mg (1.01 mmol, 1 Äq.)

PEP (**1**) (1M): 1.0 ml (1.21 mmol, 1.1 Äq.)

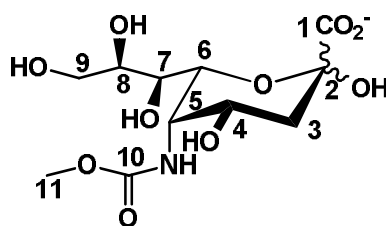
PseS<sub>Cje</sub>: 40 mg

Bicin-Puffer (50 mM, pH= 8.0): 3995 µl

20 mM MnCl<sub>2</sub> (2M): 50 µl

R<sub>f</sub> = 0.38 (n-BuOH/Aceton/AcOH/H<sub>2</sub>O, 35:35:7:23)

Ausbeute: 27 mg (7.7%) als farbloser Feststoff



<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, 300 K, D<sub>2</sub>O): δ = 3.97-3.89 (m, 2H, 4-, 6-H), 3.84 (dd, *J* = 4.4, 1.5 Hz, 1H, 5-H), 3.75 (dd, *J* = 11.9, 2.6 Hz, 1H, 9-Ha), 3.68 (ddd, *J* = 9.7, 4.5 Hz, 1H, 8-H), 3.63 (s, 3H, 11-H), 3.53 (dd, *J* = 11.8, 4.9 Hz, 1H, 9-Hb), 3.43 (d, *J* = 9.2, 1.1 Hz, 1H, 7-H), 2.36 (dd, *J* = 9.6, 4.8 Hz, 1H, 3-Ha), 1.90 (t, *J* = 11.8 Hz, 1H, 3-Hb) ppm.

<sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, 300 K, D<sub>2</sub>O): δ = 178.12 (C-1, -10), 96.80 (C-2), 70.88 (C-8), 70.56 (C-6), 69.33 (C-7), 67.14 (C-4), 63.75 (C-9), 53.27 (C-5), 48.08 (C-11), 39.91 (C-3) ppm.

---

## 6 Anhang

---

### 6.1 Gensequenzen und Plasmidkarten

Nachfolgend aufgeführt sind alle Gensequenzen der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Sialinsäuresynthase aus den pathogenen Mikroorganismen *Neisseria meningitidis* und *Campylobacter jejuni*, sowie die jeweiligen Plasmidkarten für die entsprechend verwendeten Expressionsvektoren.

Alle Gensequenzen stammen aus der Datenbank „BioCyc Database collection“®.

#### 6.1.1 *N*-Acetylneuraminsäuresynthase aus *Neisseria meningitidis* (NeuS<sub>Nme</sub>)

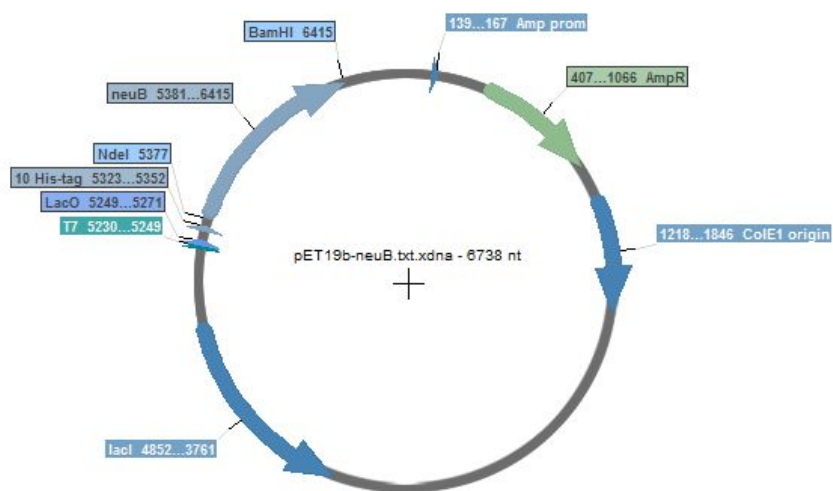
<http://biocyc.org/gene?orgid=NMEN862513-HMP&id=GMML-2209-MONOMER>

>gnl|NMEN862513-HMP|GMML-2209 neuB "GMML-2209-MONOMER" 2003953..2005002 *Neisseria meningitidis* ATCC 13091 *Neisseria meningitidis* ATCC 13091 genomic scaffold SCAFFOLD1, whole genome shotgun sequence.

```
atgCAAAACA ACAACGAATT TAAAATTGGT AATCGTTCAG TAGGTTACAA CCACGAACCA
TTGATTATCT GTGAAATCGG CATCAATCAT GAAGGCTCTT TAAAAACAGC TTTTGAAATG
GTTGATGCTG CCTATAATGC AGGCGCTGAA GTTGTTAAAC ATCAAACACA CATCGTTGAA
GACGAAATGT CTGATGAGGC CAAACAAGTC ATTCCAGGCA ATGCAGATGT CTCTATTTAT
GAAATTATGG AACGTTGCGC CCTGAATGAA GAAGATGAGA TTAAATTAAA AGAATACGTA
GAGAGTAAGG GTATGATTTT TATCAGTACT CCTTTCTCTC GTGCAGCTGC TTTACGATTA
CAACGTATGG ATATTCCAGC ATATAAAATC GGCTCTGGCG AATGTAATAA CTACCCATTA
ATTAAACTGG TGGCCTCTTT TGGTAAGCCT ATTATTCTCT CTACCGGCAT GAATTCTATT
GAAAGCATCA AAAAGTCGGT AGAAATTATT CGAGAAGCAG GGGTACCTTA TGCTTTGCTT
CACTGTACCA ACATCTACCC AACCCCTTAC GAAGATGTTC GATTGGGTGG TATGAACGAT
TTATCTGAAG CCTTCCAGA CGCAATCATT GGCTGTCTG ACCATACCTT AGATAACTAT
GCTTGCTTAG GAGCAGTAGC TTTAGGCGGT TCGATTTTAG AGCGTCACTT TACTGATCGC
ATGGATCGCC CAGGTCCGGA TATTGTATGC TCTATGAATC CGGATACTTT TAAAGAGCTC
AAGCAAGGCG CTCATGCTTT AAAATTGGCA CGCGGCGGCA AAAAAGACAC GATTATCGCG
GGAGAAAAGC CAACTAAAGA TTTCGCCTTT GCATCTGTCG TAGCAGATAA AGACATTAAA
AAAGGAGAAC TGTGTCCGG AGATAACCTA TGGGTAAAC GCCCAGGCAA TGGAGACTTC
AGCGTCAACG AATATGAAAC ATTATTTGGT AAGGTCGCTG CTGCAATAT TCGCAAAGGT
GCTCAAATCA AAAAACTGA TATTGAAtaa
```



Restriction map of pET19b-neuB.btx.dna - 6738 nt  
<Serial Cloner V2.5> -- <Di, 6. Dez 2016 13:20>



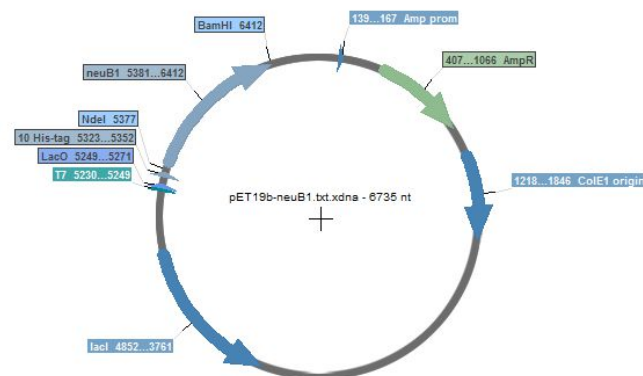
## 6.1.2 N-Acetylneuraminsäuresynthese aus *Campylobacter jejuni* (NeuS<sub>Cje</sub>)

<http://biocyc.org/gene?orgid=CJEJ192222&id=GJTS-1070-MONOMER>

```
>gnl|CJEJ192222|GJTS-1070 neuB1 "GJTS-1070-MONOMER" 1075450..1076481 Campylobacter jejuni
jejuni NCTC 11168 = ATCC 700819
```

```
atgCAAATAA AAATAGATAA ATTAACATATT TCTCAGAAAA ATCCTTTGAT AATCCCTGAA
ATAGGTATAA ATCACAATGG TAGTTTAGAA ATAGCAAAAC TTATGGTAGA TGCGGCCAAA
AGAGCAGGAG CTAAGATAAT AAAACACCAA ACTCATATAG TCGAAGATGA AATGAGCCAA
GAGGCTAAAA ATGTTATACC GGGTAATGCA AATATTAGCA TTTATGAGAT TATGGAACAA
TGTGCATTAA ACTATAAAGA TGAAGTAGCT TTTAAAGAGT ATGTAGAGAA GCAAGGTTTG
GTATATCTTA GCACTCCATT TAGTAGAGCT GCAGCAAATC GTTTAGAAGA TATGGGTGTA
AGTGCTTATA AAATAGGCTC AGGTGAATGT AATAATTATC CTTTAATAAA ACATATAGCA
CAATTTAAAA AACCTATGAT TATAAGCACC GGAATGAATA GCATAGAAAG TATAAAACCC
ACAGTTAAGA TACTTAGAGA TTATGAAATA CCTTTTGTTT TGCTTCATAC TACAAATTTA
TATCCTACTC CATCGCACTT AGTAAGATTA CAAGCTATGT TAGAATTATA TAAAGAGTTT
AATTGTCTTT ATGGACTTAG TGATCATACC ACAAACAATC TTGCATGTAT AGGTGCAATA
GCTCTTGGAG CAAGTGTAAT AGAAAGACAC TTTACAGATA CCATGGACAG AAAAGGCCCT
GATATAGTTT GCTCTATGGA TGAAAGCACT TTTAAAGATC TTATAAATCA AACACAAGAA
ATGGTGCTTT TAAGAGGCGA TAATAATAAA AATCCTTTAA AAGAAGAGCA AGTGACCATT
GATTTTGCAT TTGCTAGTGT AGTAAGTATT AAAGATATAA AAAAGGGTGA AATTTTATCT
ATGGATAATA TTTGGGTAAA AAGACCTTCA AAAGGTGGTA TAAGTGCAAA GGATTTTGAA
GCCATACTTG GAAAAAGAGC AAAAAAAGAT ATAAAAATA ATATACAAC AACATGGGAT
GATTTTGAA t ga
```

Restriction map of pET19b-neuB1.txt.xdna - 6735 nt  
<Serial Cloner V2.5> -- <Di, 6. Dez 2016 13:18>



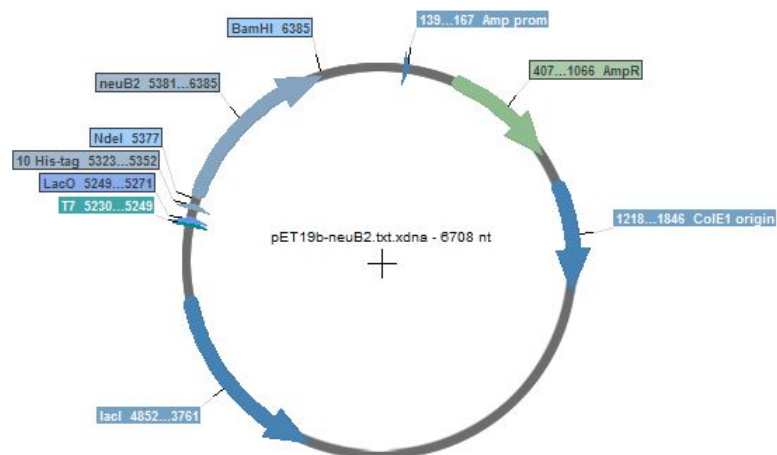
### 6.1.3 NeuB2-Protein aus *Campylobacter jejuni* (NeuB2<sub>Cje</sub>)

<http://biocyc.org/gene?orgid=CJEJ192222&id=GJTS-1250-MONOMER>

>gnl|CJEJ192222|GJTS-1250 neuB2 "GJTS-1250-MONOMER" 1254132..1255136 Campylobacter jejuni  
jejuni NCTC 11168 = ATCC 700819

```
atgAAAAAAAA CTTTAATCAT CGCAGAAGCA GGAGTTAATC ACAATGGTGA TTAAATTTTA
GCTAAAAAGT TAATAGAAAT CGCAGCAGAT TCAGGAGCTG ATTTTGTTAA ATTTCAAAGT
TTTAAAGCCA AAAACTGTAT CAGCACAAAG GCTAAAAAG CACCCATATCA GCTTAAACC
ACGGCTAATG ATGAAAGTCA GCTTCAAATG GTGCAAAAAC TCGAACTCGA TCTTAAAGCT
CATAAAGAGC TTATCTTACA CGCAAAAAAA TGCAATATCG CCTTCTTTTC TACTCCTTTT
GATCTTGAAA GTGTAGATCT TTTAAATGAG TTAGGCTTAA AAATCTTTAA AATTCCAAGC
GGAGAAATCA CCAATCTACC CTATCTTAAA AAAATTGCAA AGCTTAATAA AAAAATCATA
CTTCAACAG GCATGGCAAA TTTAGGCGAG ATAGAAGAAG CTTTAAATGT GCTTTGCAAA
AATGGCGCTA AACGCCAAAA TATCACTCTT TTACACTGCA CTACAGAATA CCCTGCCCTT
TTTAATGAAG TCAATCTTAA AGCCATGCAA AGCTTAAAAG ACGCTTTTAA GCTTGATGTG
GGTTATTCTG ATCACACAAG GGTATACAC ATTTCCCTAG CTGCGGTTGC CTTGGGAGCT
TGTGTGATAG AAAAGCATTT TACTCTAGAC AAAAATATGT CAGGGCCTGA TCATAAAGCA
AGCCTAGAAC CTCAAGAACT AAAAATGCTT TGTACCCAAA TAAGACAAAT ACAAAGGCA
ATGGGTGATG GCATAAAAAA AGCAAGTAAA AGCGAACAAA AAAATATCAA CATAGTAAGA
AAAAGTTTAG TGCCAAAAA AGACATCAA AAAGGAGAAA TTTTTCGCGA AGGAAATCTT
ACTACCAAAC GCCCCGAAA TGGTATAAGT GCTATGAGAT ATGAAGAGTT TTTGGGTAAG
ATTGCTACTA AAAACTACAA AGAAGATGAG CTTATCCGTG AGtaa
```

Restriction map of pET19b-neuB2.txt.xdna - 6708 nt  
<Serial Cloner V2.5> -- <Di, 6. Dez 2016 13:16>



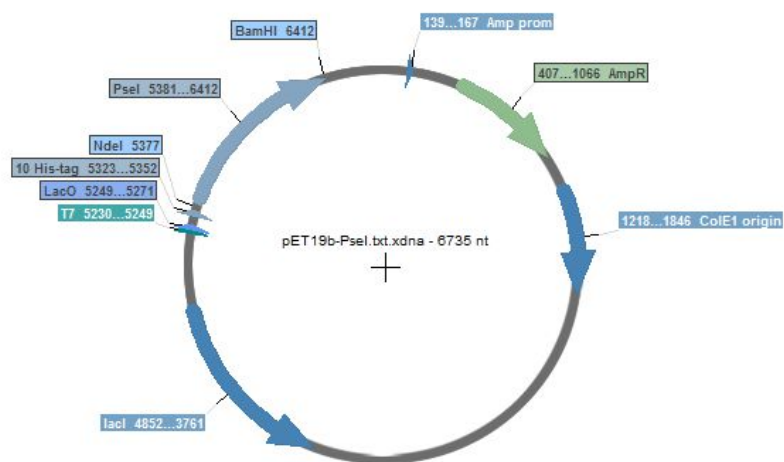
## 6.1.4 Pseudaminsäuresynthese aus *Campylobacter jejuni* (PseS<sub>Cje</sub>)

<http://biocyc.org/gene?orgid=CJEJ192222&id=GJTS-1244>

>gnl|CJEJ192222|GJTS-1244 pseI "GJTS-1244-MONOMER" 1245650..1246681 Campylobacter jejuni  
jejuni NCTC 11168 = ATCC 700819

```
atgCAAATAG GAAATTTTAA CACCGATAAA AAGGTTTTTA TCATAGCAGA ACTTAGTGCA
AATCACGCAG GAAGTCTTGA AATGGCACTT AAAAGCATAA AAGCAGCCAA AAAAGCAGGT
GCTGATGCGA TAAAAATCCA AACTTACACT CCAGATAGCC TCACACTAAA TAGCGATAAA
GAAGATTTTA TCATCAAAGG AGGACTTTGG GACAAAAGAA AACTTTATGA GCTTTATGAA
AGTGCAAAAA CCCCTTATGA ATGGCATTCT CAAATCTTTG AAACCGCACA AAATGAAGGC
ATACTTTGTT TTTCAAGTCC CTTTGCTAAA GAAGATGTAG AATTTCTTAA ACGCTTTGAT
CCTATAGCCT ATAAAATCGC TTCTTTTGAA GCCAATGATG AAAATTTTCGT GCGTTTAATC
GCCAAAGAAA AAAAACCTAC TATCGTTTCA ACGGGCATTG CTACAGAAGA AGAACTTTTT
AAAATCTGTG AAATTTTAA AGAAGAAAAA AATCCTGATT TAGTCTTTT AAAATGTACT
TCAACTTATC CTAAGTCCAT AGAAGATATG AATTTAAAAG GTATAGTAAG TTAAAAGAA
AAATTTAATG TTGAAGTGGG ACTAAGTGAT CATAGCTTTG GCTTTTATAG CCCTGTTATG
GCAGTAGCAC TTGGAGCTAG AGTGATAGAA AAGCATTTTA TGTTAGATAA AAGCATAGAA
AGTGAAGACA GTAAATTTAG TCTTGATTTT GATGAATTTA AAGCTATGGT AGATGCAGTA
AGACAAGCTG AAAGTGCTTT AGGCGATGGT AAGTTAGATC TAGATGAAAA GGTGCTTAAA
AACCGTGTTC TTGCAAGAAG CTTATATGCA AGTAAGGATA TCAAAAAGG TGAAATGTTC
AGCGAAGAAA ATGTAAAATC CGTGCCTCCT TCTTTTGGAC TACATCCTAA ATTTTATCAA
GAACTTTTAG GAAAAAAGC CAGTAAAGAT ATAAAATTG GCGATGCTTT AAAACAAGGA
GATTTCCAat ga
```

Restriction map of pET19b-PseI.btx.dna - 6735 nt  
<Serial Cloner V2.5> -- <Di, 6. Dez 2016 13:28>



## 6.2 Literatur

- [1] R. Schauer, *Zoology* **2004**, *107*, 49-64.
- [2] A. Varki, *Trends Mol Med* **2008**, *14*, 351-360.
- [3] I. Benz, M. A. Schmidt, *Molecular Microbiology* **2002**, *45*, 267-276.
- [4] R. Schauer, *Glycoconjugate journal* **2000**, *17*, 485-499.
- [5] G. Blix, *Z. physiol. Chem.*, **1936**, *240*, 43-54.
- [6] G. Blix, L. Svennerholm, I. Werner, *Acta Chemica Scandinavica* **1952**, *6*, 358-362.
- [7] C. Robbe, C. Capon, E. Maes, M. Rousset, A. Zweibaum, J.P. Zanetta, J. C. Michalski, *The Journal of biological chemistry* **2003**, *278*, 46337-46348.
- [8] J.-P. Zanetta, A. Pons, M. Iwersen, C. Mariller, Y. Leroy, P. Timmerman, R. Schauer, *Glycobiology* **2001**, *11*, 663-676.
- [9] R. S. Blacklow, L. Warren, *The Journal of biological chemistry* **1962**, *237*, 3520-3526.
- [10] V. P. Richards, T. Lefebure, P. D. Pavinski Bitar, M. J. Stanhope, *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases* **2013**, *14*, 200-213.
- [11] C. J. Day, E. A. Semchenko, V. Korolik, *Front Cell Infect Microbiol* **2012**, *2*, 9.
- [12] P. A. Glaze, D. C. Watson, N. M. Young, M. E. Tanner, *Biochemistry* **2008**, *47*, 3272-3282.
- [13] S. Inoue, K. Kitajima, Y. Inoue, *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 24341-24344.
- [14] T. Angata, A. Varki, *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 439-469.
- [15] G. Blix, E. Lindberg, L. Odin, I. Werner, *Nature* **1955**, *175*, 340-341.
- [16] M. Zunk, M. J. Kiefel, *RSC Adv.* **2014**, *4*, 3413-3421.
- [17] A. Varki, R. Schauer, *Essentials of Glycobiology 2th Edition* **2009**.
- [18] A. K. Shukla, C. Schröder, U. Nöhle, R. Schauer, *Carbohydrate research* **1987**, *168*, 199-209.
- [19] A. Varki, *Glycobiology* **1992**, *2*, 25-40.
- [20] C. Traving, R. Schauer, *Cell. Mol. Life Sci.* **1998**, *54*, 1330-1349.
- [21] U. L. Khatun, A. Gayen, C. Mukhopadhyay, *Glycoconjugate journal* **2014**, *31*, 435-447.
- [22] B. Ermolinsky, M. Peredelchuk, D. Provenzano, *J Med Microbiol* **2013**, *62*, 1011-1014.
- [23] S. Tsuji, K. Datta, J. C. Paulson, *Glycobiology* **1996**, *6*, v-vii.
- [24] S. Tsuji, *Journal of biochemistry* **1996**, *120*, 1-13.
- [25] E. D. Green, G. Adelt, J. U. Baenziger, *J. Biol. Chem* **1988**, *263*, 18253-18268.
- [26] S. Takasaki, K. Yamashita, K. Suzuki, S. Iwanaga, A. Kobata, *J. Biol. Chem* **1979**, *254*, 8548-8553.
- [27] M. N. Fukuda, A. Dell, J. E. Oates, M. Fukuda, *J. Biol. Chem.* **1985**, *260*, 6623-6631.
- [28] F. Ahmad, P. McPhie, *Int. J. Biochem.* **1980**, *11*, 91-96.
- [29] R. Schauer, *Trends in Biochemical Sciences* **1985**, *10*, 357-360.
- [30] J. Gunawan, D. Simard, M. Gilbert, A. L. Lovering, W. W. Wakarchuk, M. E. Tanner, N. C. Strynadka, *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 3555-3563.
- [31] J. Hao, W. F. Vann, S. Hinderlich, M. Sundaramoorthy, *Biochem. J.* **2006**, *397*, 195-201.
- [32] S. M. Lawrence, K. A. Huddleston, L. R. Pitts, N. Nguyen, Y. C. Lee, W. F. Vann, T. A. Coleman, M. J. Betenbaugh, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 17869-17877.
- [33] M. E. Tanner, *Bioorg. Chem.* **2005**, *33*, 216-228.

- 
- [34] A. S. Murkin, W. K. Chou, W. W. Wakarchuck, M. E. Tanner, *Biochemistry* **2004**, *43*, 14290-14298.
- [35] W. F. Vann, D. A. Daines, A. S. Murkin, M.E. Tanner, D. O. Chaffin, C. E. Rubens, J. Vionnet, R. P. Silver, *Journal of Bacteriology* **2004**, *186*, 706-712.
- [36] Y. A. Knirel, E. V. Vinogradov, V. L. L'Vov, N. A. Kocharova, A. S. Shashkov, B.A. Dmitriev, N. A. Kochetkov, *Carbohydrate research* **1984**, *133*, C5-C8.
- [37] Y. A. Knirel, A. S. Shashkov, Y. E. Tsvetkov, P.E. Jansson, U. Zähringer, *Advances in Carbohydrate chemistry and biochemistry* **2003**, *58*, 371-417.
- [38] Y. A. Knirel, E. Th Rietschel, R. Marre, U. Zähringer, *Eur. J. Biochem.* **1994**, *221*, 239-245.
- [39] C. P. Ewing, E. Andreishcheva, P. Guerry, *J Bacteriol* **2009**, *191*, 7086-7093.
- [40] C. L. M. Stults, C. C. Sweeley, B. A. Macher, *Methods in Enzymology* **1989**, *179*, 167-214.
- [41] P. Burda, M. Aebi, *Biochim. Biophys. Acta* **1998**, *1426*, 239-257.
- [42] L. Warren, R. S. Blacklow, *J. Biol. Chem.* **1962**, *237*, 3527-3534.
- [43] M. G. Ambrose, S. J. Freese, M. S. Reinhold, T. G. Warner, W. F. Vann, *Biochemistry* **1992**, *31*, 775-780.
- [44] N. M. Samuels, B. W. Gibson, S. M. Miller, *Biochemistry* **1999**, *38*, 6195-6203.
- [45] I. G. Bravo, S. Garcia-Vallve, A. Romeu, A. Reglero, *Trends Microbiol* **2004**, *12*, 120-128.
- [46] N. He, **2011**, Dissertation, Technische Universität Darmstadt, Darmstadt.
- [47] E. L. Kean, *Glycobiology* **1991**, *1*, 441-447.
- [48] T. Yamamoto, *Mar Drugs* **2010**, *8*, 2781-2794.
- [49] C. P. Chiu, A. G. Watts, L. L. Lairson, M. Gilbert, D. Lim, W. W. Wakarchuk, S. G. Withers, N. C. Strynadka, *Nat Struct Mol Biol* **2004**, *11*, 163-170.
- [50] S. M. Steenbergen, E. R. Vimr, *The Journal of biological chemistry* **2003**, *278*, 15349-15359.
- [51] G.-J. Shen, A. K. Datta, M. Izumi, K. M. Koeller, C.-H. Wong, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 35319-35146.
- [52] D. S. Stephens, *Vaccine* **2009**, *27 Suppl 2*, B71-B77.
- [53] N. meningitidis, University of Leicester, Virtual Genomics Education Centre.
- [54] J. Hao, P. Balagurumoorthy, S. Sarilla, M. Sundaramoorthy, *Biochemical and biophysical research communications* **2005**, *338*, 1507-1514.
- [55] F. Liu, H. J. Lee, N.C. Strynadka, M. E. Tanner, *Biochemistry* **2009**, *48*, 9194-9201.
- [56] D. D. Joseph, W. Jiao, E. J. Parker, *Biochemistry* **2013**, *52*, 2609-2619.
- [57] Y. G. Choi, C. J. Park, H. E. Kim, Y. J. Seo, A. R. Lee, S. R. Choi, S. S. Lee, J. H. Lee, *J Biomol NMR* **2015**, *61*, 137-150.
- [58] A. K. Sundaram, L. Pitts, K. Muhammad, J. Wu, M. Betenbaugh, R. W. Woodard, *Biochem. J.* **2004**, *383*, 83-89.
- [59] A. N. Harrison, S. Reichau, E. J. Parker, *Bioorg Med Chem Lett* **2012**, *22*, 907-911.
- [60] L. Kaustov, S. Kababya, S. C. Du, T. Baasov, T. Gropper, Y. Shoham, A. Schmidt, *Biochemistry* **2000**, *39*, 14865-14876.
- [61] T. Baasov, S. Shefferdeenoor, A. Kohen, A. Jakob, V. Belakhov, *Eur J Biochem* **1993**, *217*, 991-999.
- [62] S. Shulami, C. Furdui, N. Adir, Y. Shoham, K. S. Anderson, T. Baasov, *Journal of Biological Chemistry* **2004**, *279*, 45110-45120.
- [63] P. H. Ray, *J. Bacteriol.* **1980**, *141*, 635-644.
- [64] S. Shulami, O. Yaniv, E. Rabkin, Y. Shoham, T. Baasov, *Extremophiles* **2003**, *7*, 471-481.
- [65] I. A. Shumilin, R. Bauerle, J. Wu, R. W. Woodard, R. H. Kretsinger, *J. Mol. Biol.* **2004**, *341*, 455-466.

- [66] S. R. Walker, H. Cumming, E. J. Parker, *Organic & biomolecular chemistry* **2009**, 7, 3031.
- [67] P. J. Cross, A. L. Pietersma, T. M. Allison, S. M. Wilson-Coutts, F. C. Cochrane, E. J. Parker, *Protein Sci* **2013**, 22, 1087-1099.
- [68] K. Aisaka, A. Igarashi, K. Yamaguchi, T. Uwajima, *Biochem. J.* **1991**, 276, 541-546.
- [69] M. Knorst, **1999**, Dissertation, Rheinisch-westfälischen Technischen Hochschule Aachen, Aachen.
- [70] P. Unruh, **2007**, Dissertation, Technische Universität Darmstadt, Darmstadt.
- [71] P. Thibault, S. M. Logan, J. F. Kelly, J. R. Brisson, C. P. Ewing, T. J. Trust, P. Guerry, *The Journal of biological chemistry* **2001**, 276, 34862-34870.
- [72] C. jejuni, University of Leicester, Virtual Genomic Education Centre.
- [73] D. Linton, A.V. Karlyshev, P.G. Hitchen, H.R. Morris, A. Dell, N.A. Gregson, B. W. Wren, *Molecular Microbiology* **2000**, 35, 1120-1134.
- [74] L. Masson, B. E. Holbein, *Journal of Bacteriology* **1983**, 154, 728-736.
- [75] P. Guerry, *Infect Immun* **2002**, 70, 787-793.
- [76] S. Sonnino, L. Mauri, V. Chigorno, A. Prinetti, *Glycobiology* **2007**, 17, 1R-13R.
- [77] B. van den Berg, C. Walgaard, J. Drenthen, C. Fokke, B. C. Jacobs, P. A. v. Doorn, *Nat Rev Neurol* **2014**, 10, 469-482.
- [78] I. Nachamkin, J. Liu, M. Li, H. Ung, A. P. Moran, M. M. Prendergast, K. Sheikh, *Infect Immun* **2002**, 70, 5299-5303.
- [79] T. Roberts, A. Shah, J. G. Graham, I. N. McQueen, *J. Neurol. Neurosurg Psychiatry* **1987**, 50, 1557-1558.
- [80] S. D. W. K. Chou, W. W. Wakarchuk, M. E. Tanner, *The Journal of biological chemistry* **2005**, 280, 35922-35928.
- [81] N. Kojima, M. Kono, Y. Yoshida, Y. Tachida, M. Nakafuku, S. Tsuji, *Journal of Biological Chemistry* **1996**, 271, 22058-22062.
- [82] D. Yi, **2012**, Dissertation, Technische Universität Darmstadt, Darmstadt.
- [83] S. Jäger, **2014**, Bachelorarbeit, Technisches Universität Darmstadt, Darmstadt.
- [84] Z. Wang, **2010**, John Wiley & Sons, Inc., 2168-2172.
- [85] G. Limberg, G. C. Slim, R. H. Furneaux, C. A. Compston, P. Stangier, M. M. Palcic, *Liebigs Annalen* **2006**, 1996, 1773-1784.
- [86] Y. Zhang, X. Le, N. J. Dovichi, C. A. Compston, M. M. Palcic, P. Dietrich, O. Hindsgaul, *Anal. Biochem.* **1995**, 227, 368-376.
- [87] J. Y. Zhao, N. J. Dovichi, O. Hindsgaul, S. Gosselin, M. M. Palcic, *Glycobiology* **1994**, 4, 239-242.
- [88] X. Le, C. Scaman, Y. Zhang, J. Zhang, N. J. Dovichi, O. Hindsgaul, M. M. Palcic, *J. Chromatogr. A* **1995**, 716, 215-220.
- [89] M. S. Goncalves, *Chemical reviews* **2009**, 109, 190-212.
- [90] C. F. H. Allen, G. H. W. McKee, *Org. Synth.* **1943**, 15-17.
- [91] J. L. Reymond, T. Koch, J. Schroer, E. Tierney, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1996**, 93, 4251-4256.
- [92] S. H. Mihindukulasuriya, T. K. Morcone, L. B. McGown, *Electrophoresis* **2003**, 24, 20-25.
- [93] B. Qiu, L. Guo, Z. Chen, Y. Chi, L. Zhang, G. Chen, *Biosens Bioelectron* **2009**, 24, 1281-1285.
- [94] S. A. Cosnier, R. S. Marks, E. R. Ionescu, **2011**, (Universite Joseph Fourier - Grenoble 1, Fr.; Ben-Gurion University of the Negev Research and Development Authority; Centre National De La Recherche Scientifique - CNRS).
- Application: US. p. 12pp.
- [95] L. K. Basco, S. Mitaku, A. L. Skaltsounis, N. Ravelomanantsoa, F. Tillequin, M. Koch, J. L. Brasch, *Antimicrob. Agents Chemother.* **1994**, 38.



- [96] N. Guilbaud, S. Léonce, F. Tillequin, M. Koch, J. A. Hickman, A. Pierré, *anti-cancer drugs* **2002**, *13*, 445-449.
- [97] V. V. R. Prasad, G. J. Peters, C. Lemos, I. Kathmann, Y. C. Mayur, *Eur J Pharm Sci* **2011**, *43*, 217-224.
- [98] H. C. Kolb, M. G. Finn, K. B. Sharpless, *Ang. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 2004-2021.
- [99] M. Meldal, C. W. Tornoe, *Chemical reviews* **2008**, *108*, 2952-3015.
- [100] J. C. Jewett, E. M. Sletten, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 3688-3690.
- [101] H. Ando, I. Akihiro, *Trends Glycosci Glyc* **2004**, *16*, 293-303.
- [102] G. J. Boons, *Carbohydrate-based Drug Discovery* **2003**, *1*, 55-102, Wiley-VCH Verlag GmbH&Co. KGaA, Weinheim, Germany.
- [103] E. A. Voight, C. Rein, S. D. Burke, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 8489-8499.
- [104] N. Huynh, A. Aye, Y. Li, H. Yu, H. Cao, V. K. Tiwari, D. W. Shin, X. Chen, A. J. Fisher, *Biochemistry* **2013**, *52*, 8570-8579.
- [105] L. B. Rodriguez-Aparicio, M. A. Ferrero, A. Reglero, *Biochem. J.* **1995**, *308*, 501-505.
- [106] A. Liav, N. Sharon, *Carbohydrate research* **1973**, *30*, 109-136.
- [107] Y. J. Lee, A. Kubota, A. Ishiwata, Y. Ito, *Tetrahedron Letters* **2011**, *52*, 418-421.
- [108] G. L. Jessen, R. A. Quiñones, R. R. González, *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* **2009**, *89*, 1171.
- [109] M. Sato, M. Takeuchi, N. Kanno, E. Nagahisa, Y. Sato, *Comp. Biochem. Physiol. B.* **1993**, *106*, 955-960.
- [110] N. A. Kocharova, A. N. Kondakova, O. G. Ovchinnikova, A. V. Perepelov, A. S. Shashkov, Y. A. Knirel, *Carbohydrate research* **2009**, *344*, 2060-2062.
- [111] Y. C. Lee, H. M. Wu, Y. N. Chang, W. C. Wang, W. H. Hsu, *Journal of molecular biology* **2007**, *367*, 895-908.
- [112] K. Tabata, S. Koizumi, T. Endo, A. Ozaki, *Enzyme Microb. Technol.* **2002**, *30*, 327-333.
- [113] L. Klermund, A. Groher, K. Castiglione, *Journal of biotechnology* **2013**, *168*, 256-263.
- [114] S. Hinderlich, S. Nohring, C. Weise, P. Franke, R. Stasche, W. Reutter, *Eur. J. Biochem.* **1998**, *252*, 133-139.
- [115] H. Inoue, K. Fukui, S. Takahashi, Y. Miyake, *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 6556-6561.
- [116] A. Datta, *Biochem.* **1970**, *9*, 3363-3370.
- [117] K. Hippler, **2013**, Bachelorarbeit, Technische Universität Darmstadt, Darmstadt.
- [118] B. R. M. J. Vethaseelan, **2014**, Bachelorarbeit, Technische Universität Darmstadt, Darmstadt.
- [119] S. Bi, L. G. Baum, *Biochim Biophys Acta* **2009**, *1790*, 1599-1610.
- [120] T. Yamamoto, Y. Takakura, H. Tsukamoto, *Trends Glycosci. Glycotechnol.* **2006**, *18*, 253-265.
- [121] A. Varki, *Glycobiology* **1993**, 97-130.
- [122] P. Gagneux, A. Varki, *Glycobiology* **1999**, 747-755.
- [123] M.N. Christiansen, J. Chik, L. Lee, M. Anugraham, J. L. Abrahams, N. H. Packer, *Proteomics* **2014**, *14*, 525-546.
- [124] M. J. Schultz, A. F. Swindall, S. L. Bellis, *Cancer Metastasis Rev* **2012**, *31*, 501-518.
- [125] S. S. van Berkel, M. B. van Eldijk, J. C. v. Hest, *Angew Chem Int Ed Engl* **2011**, *50*, 8806-8827.
- [126] M. Köhn, R. Breinbauer, *Angewandte Chemie* **2004**, *116*, 3168-3178.
- [127] E. Saxon, C. R. Bertozzi, *Science* **2000**, *287*, 2007-2010.
- [128] C. Unverzagt, H. Kunz, J. C. Paulson, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *113*.
- [129] W. F. Vann, R. P. Silverll, C. Abeijon, K. Chang, W. Aaronson, C. W. F. A. Sutton, W. Lindner, M. Kotsatos, *J. Biol. Chem* **1987**, *262*, 17556-17562.



- 
- [130] G. T. Barry, J. D. Hamm, M. G. Graham, *Nature (London, United Kingdom)* **1963**, 200, 806-807.
- [131] E. L. Kean, S. Roseman, *J. Biol. Chem* **1966**, 241, 5643-5650.
- [132] M. R. Webb, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1992**, 89, 4884-4887.
- [133] M. M. Bradford, *Anal. Biochem.* **1976**, 72, 248-254.
- [134] M. Zunk, J. Williams, J. Carter, M. J. Kiefel, *Organic & biomolecular chemistry* **2014**, 12, 2918-2925.
- [135] F. C. C. M. Ahn, M. L. Patchett, E. J. Parker, *Bioorganic & medicinal chemistry* **2008**, 16, 9830-9836.
- [136] F. Kona, P. Tao, P. Martin, X. Xu, D. L. Gatti, *Biochemistry* **2009**, 48, 3610-3630.
- [137] T. M. Allison, F. C. Cochrane, G. B. Jameson, E. J. Parker, *Biochemistry* **2013**, 52, 4676-4686.
- [138] R. Vainer, V. Belakhov, E. Rabkin, T. Baasov, N. Adir, *Journal of molecular biology* **2005**, 351, 641-652.
- [139] L. C. Heyes, S. Reichau, P. J. Cross, G. B. Jameson, E. J. Parker, *Bioorg Chem* **2014**, 57, 242-250.
- [140] K. Arnold, L. Bordoli, J. Kopp, T. Schwede, *Bioinformatics* **2006**, 22, 195-201.
- [141] M. Biasini, S. Bienert, A. Waterhouse, K. Arnold, G. Studer, T. Schmidt, F. Kiefer, T. G. Cassarino, M. Bertoni, L. Bordoli, T. Schwede, *Nucleic Acids Research* **2014**, 42, W252-W258.
- [142] N. Guex, M. C. Peitsch, T. Schwede, *Electrophoresis* **2009**, 30 Suppl 1, S162-173.
- [143] F. Kiefer, K. Arnold, M. Kunzli, L. Bordoli, T. Schwede, *Nucleic Acids Res* **2009**, 37, D387-392.
- [144] D. Seeliger, B. L. d. Groot, *J Comput Aided Mol Des* **2010**, 24, 417-422.
- [145] T. Hall, **2004**, Ibis Therapeutics, a division of Ibis Pharmaceuticals, Inc.
- [146] P. M. Hollingsworth, R. A. Ennos, *Heredity (Edinb)* **2004**, 92, 490-498.
- [147] K. Howe, A. Bateman, R. Durbin, *Bioinformatics* **2002**, 18, 1546-1547.



---

Mark Schnellbacher  
Nibelungenstraße 744  
64686 Lautertal-Gadernheim

Lautertal, 08.09. 2016

### **Erklärung**

Ich erkläre hiermit, dass ich meine Dissertationsarbeit selbstständig und nur mit den angegebenen Hilfsmittel an angefertigt habe.

Mark Schnellbacher



---

Mark Schnellbacher  
Nibelungenstraße 744  
64686 Lautertal-Gadernheim

Lautertal, 08.09. 2016

### **Erklärung**

Ich erkläre hiermit, noch keinen Promotionsversuch unternommen zu haben.

Mark Schnellbacher



---

## Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name: Mark Schnellbächer  
Adresse: Nibelungenstraße 744  
64686 Lautertal-Gadernheim  
Geburtstag: 04.12.1979  
Geburtsort: Lindenfels  
Familienstand: Ledig

### Bildungsweg

08/2008-06/2014 Promotion, wissenschaftlicher Mitarbeiter  
AK Prof. Dr. Wolf-Dieter Fessner  
Fachrichtung: Organische Chemie, Biochemie  
Technische Universität Darmstadt

01/2008-07/2008 Diplomarbeit (Urteil: sehr gut)  
AK Prof. Dr. Peter Friedl  
Fachrichtung: Biochemie  
Titel: „*Konstruktion und Charakterisierung eines Tetraxclin-regulierbaren Vektors zur Immortalisierung humaner Nabelschnurendothelzellen*“

11/2007-12/2007 Diplomprüfungen (Urteil: gut)

03/2003 Vordiplomprüfungen (Urteil: befriedigend)

10/2000-07/2008 Studium der Chemie (Diplom)  
Technische Universität Darmstadt  
Abschluß: Diplom-Ingenieur (Chemie)  
Schwerpunkt: Organische Chemie und Biochemie

08/1990-05/1999 Altes kurfürstliches Gymnasium Bensheim  
Abschluß. Abitur (Note: befriedigend)

Lautertal, 08.09.2016